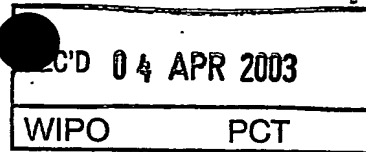


Rec'd PCT/PTO 22 SEP 2004
PCT/JP 03/00564
RO/KR 22.03.2003



10/508759



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

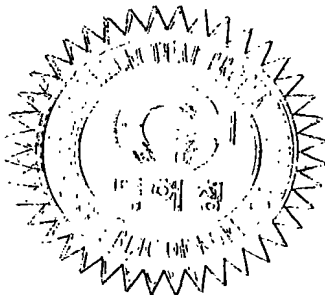
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0015708
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 03월 22일
Date of Application MAR 22, 2002

출원인 : (주) 에이프로젠
Applicant(s) APROGEN, INC.

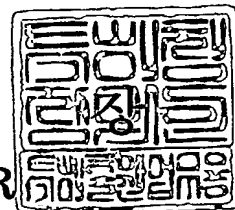
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 02 월 14 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.03.22
【발명의 명칭】	인간화 항체 및 그의 제조방법
【발명의 영문명칭】	HUMANIZED ANTIBODY AND PROCESS FOR PREPARING SAME
【출원인】	
【명칭】	(주)에이프로젠
【출원인코드】	1-2001-037163-0
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-054600-2
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-054598-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	홍효정
【성명의 영문표기】	HONG, Hyo Jeong
【주민등록번호】	560612-2011112
【우편번호】	302-772
【주소】	대전광역시 서구 둔산1동 크로바아파트 117-201
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	맹철영
【성명의 영문표기】	MAENG, Cheol-Young
【주민등록번호】	680723-1163017
【우편번호】	300-200
【주소】	대전광역시 동구 용전동 176-15
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 양기혁
【성명의 영문표기】 YANG, Gi-Hyeok
【주민등록번호】 690208-1143511
【우편번호】 330-260
【주소】 충청남도 천안시 신방동 895번지 두레현대아파트 104-2101
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 장명희
【성명의 영문표기】 JANG, Meong Hee
【주민등록번호】 750901-2408718
【우편번호】 301-150
【주소】 대전광역시 중구 태평동 삼부아파트 411-95
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 오미숙
【성명의 영문표기】 OH, Mee Sook
【주민등록번호】 770206-2400922
【우편번호】 300-100
【주소】 대전광역시 동구 자양동 197-6
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 송진수
【성명의 영문표기】 SONG, Jin-Soo
【주민등록번호】 690327-1454716
【우편번호】 302-162
【주소】 대전광역시 서구 도마2동 167-16
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 장영국
【성명의 영문표기】 JANG, Young Kug
【주민등록번호】 720910-1458325

【우편번호】	302-740
【주소】	대전광역시 서구 만년동 초원아파트 101-1514
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구원 유전자은행
【수탁번호】	KCTC 10198BP
【수탁일자】	2002.03.13
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구원 유전자은행
【수탁번호】	KCTC 10199BP
【수탁일자】	2002.03.13
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	38
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 리인 실 (인) 대리인 장성구 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	49 면 49,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	24 항 877,000 원
【합계】	955,000 원
【감면사유】	소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】	286,500 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 생쥐에서 생산된 모노클로날 항체를 이용하여 인간화 항체를 제조하는 방법에 관한 것으로, 생쥐 모노클로날 항체의 상보성 결정부위(CDR)내에서 항원 결합에 중요한 아미노산 잔기들만을 인간 항체에 이식시킴으로써 기존의 인간화 항체보다 HAMA(human anti-mouse antibody) 반응을 줄이면서 항원 결합친화도가 증가된 인간화 항체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제조 방법에 의해 제조된 인간화 항체는 각종 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 7

【명세서】**【발명의 명칭】**

인간화 항체 및 그의 제조방법{HUMANIZED ANTIBODY AND PROCESS FOR PREPARING SAME}

【도면의 간단한 설명】

- 도 1은 카이메릭 중쇄의 발현벡터의 제조과정을 도식화한 것이고,
도 2는 인간화 중쇄 가변영역의 염기서열 및 아미노산서열을 나타낸 것이고,
도 3은 카이메릭 경쇄의 발현벡터의 제조과정을 도식화한 것이고,
도 4는 인간화 경쇄 가변영역의 염기서열 및 아미노산서열을 나타낸 것이고,
도 5는 중쇄 CDR 변이체의 항원결합능을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이고,
도 6은 인간화항체의 발현벡터의 제조과정을 도식화한 것이고,
도 7은 인간화항체의 항원 결합친화도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <8> 본 발명은 생쥐에서 생산된 모노클로날 항체의 가변영역의 상보성 결정부위 (complementary determining residues, CDR)내에서 항원과의 결합에 중요한 아미노산 잔기(specificity determining residues, SDR)들만을 인간 항체에 이식시키는 것을 포함하는 항원에 대한 인간화 항체의 제조방법에 관한 것이다.

- <9> 지금까지 B형 간염 등 감염성 질환의 예방 및 치료를 위해서는 해당 항원에 대해 인체 내에서 생성된 면역글로불린을 혈장에서 분리하여 환자에게 투여하는 방법이 일반적으로 사용되어 왔다. 그러나 면역글로불린은 혈장으로부터 추출되기 때문에 특이성 (specificity)이 낮고, 오염원에 노출될 수 있으며, 사람 혈액의 지속적인 공급이 필요하다는 단점이 있다.
- <10> 상기의 문제점을 해결하기 위하여 생쥐의 인간 항원에 대한 모노클로날 항체를 사용하는 방법이 개발되었으나, 생쥐 모노클로날 항체는 일반적으로 항원에 대한 친화도가 높고 대량 생산이 가능하지만, 사람에게 반복 주사하였을 때에 면역반응을 유발한다 (Shawler D.L. 등, *J. Immunol.*, 135, 1530-1535, 1985). 사람의 모노클로날 항체를 사용하면 이런 문제점을 해결할 수는 있지만 아직까지 항원에 대해 친화도가 높은 사람의 모노클로날 항체의 대량 생산기술이 실용화되어 있지 않다.
- <11> 생쥐 유래 모노클로날 항체의 높은 친화도와 특이성을 유지하면서 인체 내에서의 HAMA(human anti-mouse antibody) 반응을 최대한 줄일 수 있는 방법으로 생쥐 모노클로날 항체의 가변영역 중에서 항원에 결합하는 부위인 상보성 결정부위(complementarity determining region(CDR)) 만을 사람 항체에 이식시킨 "인간화 항체"가 개발되었고, 이와 같은 인간화 항체는 유전공학기술을 이용하여 대량 생산이 가능하고, 유전자의 대부분을 인간화하였으므로 인체 내에서의 면역반응을 대폭 줄일 수 있게 되었다(Riechmann L. 등, *Nature*, 332, 323-327, 1988; Nakatani T. 등, *Protein Engineering*, 7, 435-443, 1994).
- <12> 기존의 인간화 항체는 CDR-이식방법(CDR-grafting)에 의한 제조 방법으로, 생쥐 모노클로날 항체의 CDR을 인간 항체에 이식시키고, CDR의 형태(conformation)에 영향을 주

는 인간 항체의 골격부분(framework region(FR))에 있는 아미노산 잔기를 생쥐 모노클로날 항체에서 유래한 아미노산 잔기로 치환시켜 인간화 항체를 제조하였다(Riechmann 등, *Nature*, 332, 323-327, 1988; Queen C. 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 10029-10033, 1989; Nakatani 등, *Protein Engineering*, 7, 435-443, 1994). 그러나, 이와 같이 제조된 인간화 항체 역시 항체 내 존재하는 마우스 유래의 CDR을 인체에 반복 투여할 경우 HAMA 반응을 유발할 수 있다는 문제점에 대해서 보고된 바 있다(Stephens 등, *Immunology*, 85, 668-674, 1995; Sharkey 등, *Cancer Research*, 55, 5935s-5945s, 1995). 따라서, 상기 인간화 항체 내의 마우스 항체에서 유래한 CDR내에서 인간 항원 결합에 중요한 아미노산 잔기들을 인간 항체의 잔기들로 치환시키면 HAMA 반응을 감소시킬 수 있을 것이다.

<13> 항체 분자의 가변영역에는 3개의 중쇄 CDR 루프(HCDR1, HCDR2, HCDR3)와 3개의 경쇄 CDR 루프(LCDR1, LCDR2, LCDR3)가 존재하며, 인간화 항체를 제조하기 위해 CDR 이식 방법을 통해 6개 CDR을 모두 이식시켰을 때, 6개의 CDR이 전부 항원에 결합하지 않을 수도 있으며(Iwahashi M. 등, *Molecular Immunology*, 36, 1079-1091, 1999), 또한, CDR 내에 있는 아미노산 잔기들이 항원과의 결합에 관여하지 않을 수도 있다. 따라서 항원결합에 직접적으로 관여하는 잔기들만을 인간 항체에 이식시켜서, 기존의 인간화 항체보다 HAMA 반응이 줄어들어 치료효과가 개선된 인간화 항체를 개발하고자 하였다.

<14> 한편, HBV는 인체 내에서 만성 또는 급성 간염을 일으키며, 악화될 경우 간경화 및 간암의 원인이 되는 병원체로, 전세계적으로 3억 명의 환자가 있는 것으로 추산된다 (Tiollais P. 및 Buendia M.A.,

Sci. Am., 264, 48, 1991). HBV의 피막은 3개의 단백질로 구성되는데, 구체적으로 S항원을 포함하는 주(major) 단백질, S 항원과 pre-S2 항원을 포함하는 중간(middle) 단백질 및 S 항원, pre-S2 항원과 pre-S1 항원을 포함하는 대(large) 단백질로 구성된다 (Neurath A.R. 및 Kent S.B., *Adv. Vir. Res.*, 34, 65-142, 1988). 이 모든 표면항원 단백질들은 HBV를 중화시키고 무력화하는 항체를 유도한다. 그 중에서 pre-S1 항원은 감염성 바이러스 입자(infectious viral particle)에 주로 존재하고(Heermann 등, , 52, 396-402, 1984), 사람의 간세포를 감염시키는데 관여하며, pre-S1에 특이한 모노클로날 항체는 바이러스 중화에 효과적으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Neurath 등, *Cell*, 46, 429, 1986; Pontisso 등, *Virol.*, 173, 533, 1989; Neurath 등, *Vaccine*, 7, 234, 1989).

<15> 본 발명자들은 HBV의 표면항원 pre-S1에 대한 생쥐 모노클로날 항체 KR127을 개발하여(특허등록 제 246128 호), 그의 유전자들을 결정하였다(특허등록 제 250832 호). 또한, CDR-이식방법으로 KR127의 인간화 항체(HZKR127I)를 개발한 바 있다(특허등록 제 246128 호).

<16> 본 발명에서는 생쥐 모노클로날 항체의 SDR을 확인하여 인간 항체에 이식하는 방법에 의해 CDR-이식방법으로 제조된 인간화 항체보다 HAMA 반응을 더 줄일 수 있으면서 항원 결합친화도는 증가된 새로운 인간화 항체를 제조하였으며, 상기 인간화 항체를 형질 감염시키고 배양한 후 ELISA를 수행하여 항원 결합친화도를 측정한 결과, 기존의 인간화 항체보다 항원 결합친화도가 약 50배 높다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <17> 본 발명의 목적은 기존의 인간화 항체보다 HAMA 반응을 더 줄일 수 있으면서 항원 결합친화도는 증가된 인간화 항체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <18> 본 발명은 (a) 생쥐 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄의 상보성 결정부위 (complementarity determining region, CDR) 중에서 특이 결정잔기(specificity determining residue, SDR)를 확인하는 단계, 및 (b) 단계 (a)에서 확인된 SDR의 각 아미노산 잔기를 하나 이상 인간 항체의 가변영역의 대응 아미노산 위치에 이식하는 단계를 포함하는 인간화 항체의 제조 방법을 제공한다.
- <19> 본 발명은 CDR-이식에 의해 제조된 항체보다 HAMA(human anti-mouse antibody) 반응은 감소하고, 항원 결합친화도가 8.2×10^{-9} M, 바람직하게는 8.4×10^{-9} M 이상인 HBV pre-S1 항원에 대한 인간화 항체 및 이 항체의 중쇄 및 경쇄를 코드하는 DNA를 제공한다.
- <20> 본 발명은 HBV pre-S1 항원에 대한 인간화 항체의 중쇄 DNA를 포함하는 중쇄 발현 벡터, 경쇄 DNA를 포함하는 경쇄 발현벡터 및 상기 DNA를 동시에 포함하는 인간화 항체 발현벡터를 제공한다.
- <21> 본 발명은 또한 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환 세포주를 제공한다.
- <22> 본 발명의 인간화 항체 제조 방법에서, 특이 결정잔기는 CDR 내의 각 아미노산 잔기를 독립적으로 알라닌으로 치환하여 얻은 알라닌 치환 변이체의 항원 결합친화도(K_D)

를 측정함으로써 변이체의 친화도를 원래 항체의 친화도보다 감소하게 한 아미노산 잔기를 확인하여 결정할 수 있다. 확인된 특이 결정잔기를 하나 이상 인간 항체의 가변 영역의 대응 아미노산 위치에 이식하여 인간화 항체를 제조할 수 있으며, 항원 결합친화도를 더욱 증가시키기 위해 인간 항체의 CDR 중 항원 결합친화도를 증가시키는 아미노산 잔기 또는 골격 구조 중 CDR 루프(loop)의 형태에 영향을 주는 아미노산 잔기들은 추가로 도입하여 치환할 수 있다.

<23> 본 발명의 방법을 더욱 상세히 설명하기 위해 B형 간염바이러스(hepatitis B virus(HBV))의 표면항원 pre-S1에 대한 생쥐 모노클로날 항체 KR127(특허등록 제 250832호)을 예로써 인간화 항체 제조 방법을 다음과 같이 설명한다.

<24> 우선, 생쥐 모노클로날 항체 KR127의 중쇄 및 경쇄 가변영역의 항원결합부위에 해당하는 CDR들 중에서 항원과의 결합에 중요하게 작용하는 아미노산 잔기들을 동정하기 위해, KR127 항체의 중쇄 가변영역과 인간항체 불변영역 C γ 1로 조합된 카이메릭 중쇄 유전자와 KR127 항체의 경쇄 가변영역과 인간항체 불변영역 C κ 로 조합된 카이메릭 경쇄 유전자를 제조한다.

<25> B형 간염바이러스 pre-S1 항원에 대한 생쥐 모노클로날 항체인 KR127 항체의 중쇄(서열번호: 2)의 CDR인 HCDR1(aa 31-35), HCDR2(aa 50-65) 및 HCDR3(aa 95-100), 및 KR127 항체의 경쇄(서열번호: 4)의 CDR인 LCDR1(aa 24-34), LCDR2(aa 50-56) 및 LCDR3(aa 89-97)의 각각의 아미노산 잔기를 알라닌 주사 돌연변이 유발(alanine scanning mutagenesis)법을 이용하여 알라닌으로 치환한 후 생성된 각 변이체의 항원 결합친화도(K_D)를 측정함으로써 변이체의 친화도가 원래 항체의 친화도보다 바람직하게는 3배 이상 감소하게 한 아미노산 잔기를 특이 결정잔기(SDR)로 결정한다.

<26> 상기와 같이 확인된 SDR로는 KR127 항체의 중쇄의 HCDR1(aa 31-35)에서 33번 트립토판, 34번 메티오닌 및 35번 아스파라진 잔기, HCDR2(aa 50-65)에서 50번 아르기닌, 52번 티로신, 52a번 프롤린 및 55번 글리신 잔기, 그리고 HCDR3(aa 95-100)에서 95번 글루탐산, 96번 티로신 및 98번 글루탐산 잔기, 그리고 KR127 항체의 경쇄의 LCDR1에서 27b번 류신, 27d번 티로신, 27e번 세린, 28번 아스파라진, 30번 리신, 32번 티로신 및 34번 아스파라진 잔기, LCDR2에서 50번 류신 및 55번 아스파르트산 잔기, 및 LCDR3에서 89번 발린, 90번 글루타민, 91번 글리신, 92번 트레오닌, 93번 히스티딘, 94번 페닐알라닌, 95번 프롤린 및 96번 글루타민 잔기가 있다.

<27> 본 발명에서는 인간 중쇄와 인간 경쇄에 각각 상기에서 확인된 SDR 아미노산 잔기들을 이식하여 인간화 항체를 제조한다. 인간 중쇄로는 예를 들어 인간 면역글로불린 세포주 VH 유전자 단편인 DP7과 인간 면역글로불린 세포주 JH4 단편으로 이루어진 인간 중쇄 DP7-JH4를 사용할 수 있다. 또한, 인간 경쇄로는 인간 면역글로불린 세포주 VK 유전자 단편인 DPK12와 인간 면역글로불린 세포주 JK4 유전자 단편으로 이루어진 인간 경쇄 DPK12-JK4를 사용할 수 있다.

<28> 구체적으로 KR127 항체의 중쇄 가변영역과 인간 중쇄 DP7-JH4 가변영역의 아미노산 서열을 비교하여 KR127 항체의 HCDR1에서 33번 트립토판 및 35번 아스파라진 잔기, HCDR2에서 50번 아르기닌 및 52번 티로신 잔기, 및 HCDR3에서 95번 글루탐산 및 96번 티로신 잔기를 인간 중쇄 DP7-JH4에 이식하고, KR127 항체의 경쇄와 인간 경쇄(DPK2-JK4)의 아미노산 서열을 비교하여 KR127 항체의 경쇄의 LCDR1에서 27d번 티로신, 28번 아스파라진 및 34번 아스파라진 잔기, LCDR2에서 50번 류신 및 55번 아스파르트산 잔기, 및

LCDR3에서 89번 발린, 91번 글리신, 92번 트레오닌, 93번 히스티딘, 94번 페닐알라닌 및 96번 글루타민 잔기를 인간 경쇄 DPK12-JK4에 이식한다.

<29> 추가로, 항원 결합친화도를 증가시키기 위해 인간 중쇄 DP7-JH4에서 KR127 항체의 중쇄의 HCDR1 32번 잔기에 해당하는 아미노산을 알라닌 잔기로, HCDR3 97번 잔기에 해당하는 아미노산을 아르기닌 또는 알라닌 잔기로, HCDR3 98번 잔기에 해당하는 아미노산을 발린 잔기로, 또는 HCDR3 102번 잔기에 해당하는 아미노산을 아르기닌 또는 알라닌 잔기로 치환시킨다.

<30> 또한, KR127 항체의 중쇄 가변영역에서 CDR 루프의 형태에 영향을 주는 골격구조 3(framework region 3)의 71번 알라닌 및 73번 리신 잔기를 인간 중쇄 DP7-JH4에 추가로 이식하고, KR127 항체의 경쇄 가변영역에서 CDR 루프의 형태에 영향을 주는 골격구조 2의 36번 류신 및 46번 아르기닌 잔기를 인간 경쇄 DPK12-JK4에 추가로 이식한다.

<31> 이 방법으로 제조된 인간화 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호: 2의 아미노산 서열을 가지며, 바람직하게는 서열번호: 1의 뉴클레오티드 서열에 의해 코드된다. 또한 경쇄 가변영역은 서열번호: 4의 아미노산 서열을 가지며, 바람직하게는 서열번호: 3의 뉴클레오티드 서열에 의해 코드된다.

<32> 그러한 상기의 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코드하는 뉴클레오티드 서열은 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인해서 또는 상기 변이체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여 상기 변이체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 다양하게 변형된 염기 서열을 가질 수 있다.

<33> 상기 방법에 의해 제조된 HBV pre-S1 항원에 대한 인간화 항체 중쇄 HuKR127HC 및 CDR-이식에 의한 인간화 항체 HZKR127I의 경쇄로 조합된 인간화 항체의 항원 결합친화도는 인간화 항체 HZKR127I의 친화도에 비해 약 50배 높다. 또한, 상기 방법으로 제조된 인간화 항체 경쇄 HuKR127KC 및 CDR-이식에 의한 인간화 항체 HZKR127I의 중쇄로 조합된 인간화 항체의 항원 결합친화도는 인간화 항체 HZKR127I와 거의 동일하다.

<34> 한편, 항체의 경쇄와 중쇄를 동시에 발현하도록 고안된 벡터 pdCMV-dhfrC-HAV6(KCTC 10028BP)의 중쇄 및 경쇄 유전자 대신에 본 발명에서 제조한 인간화 중쇄 및 경쇄 유전자를 삽입하여 인간화 항체 중쇄 HuKR127HC 및 경쇄 HZKR127I의 동시 발현용 벡터 pdCMV-dhfrC-HuKR127을 제조한다. 벡터 pdCMV-dhfrC-HuKR127로 형질전환된 대장균 DH5 α /pdCMV-dhfrC-HuKR127은 한국생명공학연구원 유전자은행에 2002년 3월 13일자 기탁 번호: KCTC 10198BP로 기탁되었다.

<35> 한편, 벡터 pdCMV-dhfrC-HuKR127을 CHO 세포주에 형질감염시켜서 인간화 항체 HuKR127을 생산하는 CHO 세포주 CHO/HuKR127을 얻었으며, 이는 한국생명공학연구원 유전자은행에 2002년 3월 13일자 기탁번호: KCTC 10199BP로 기탁되었다. 세포주 CHO/HuKR127이 생산한 HBV pre-S1 항원에 대한 인간화 항체 HuKR127은 CDR 이식에 의해 제조된 항체보다 HAMA(human anti-mouse antibody) 반응은 감소하고 항원 결합친화도는 CDR-이식에 의한 기존의 인간화 항체들에 비해 현저히 높다.

<36> 따라서, 본 발명의 인간화 항체는 HBV 감염의 예방 및 만성 B형 간염의 치료에 안전하게 사용될 수 있다.

- <37> 본 발명의 인간화 항체는 인간 HBV pre-S1에 대한 결합친화도가 높으면서 인간의 항체와 유사한 서열을 가지므로 자가면역질환의 치료제 또는 면역억제제로서 부작용없이 효과적으로 사용될 수 있다.
- <38> 이러한 목적으로, 본 발명의 인간화 항체를 유효성분으로서 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 자가면역질환의 치료용 또는 면역억제용 약학조성물을 제조할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 경구투여용 제제 또는 비경구 투여용 제제와 같은 단위 투여형 또는 수회 투여형 약제학적 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 약학조성물은 목적하는 바에 따라 비경구투여하거나 경구투여할 수 있으며, 통상적인 투여량으로 투여할 수 있으며 하루에 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 사용될 특정 항체, 체중, 환자의 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여 방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- <39> 본 발명의 인간화 항체를 포함하는 약학 조성물의 제제화 방법, 투여방법, 투여량 등은 통상의 HBV pre-S1 항원에 대한 항체의 경우와 동일한 범위 내에서 결정할 수 있다.
- <40> 이하 본 발명의 구체적인 구성과 작용을 실시예를 들어 설명하지만 본 발명의 범위가 하기 실시예에만 제한하는 것은 아니다.
- <41> 실시예 1: 생쥐/사람 카이메릭 중쇄 유전자의 제조
- <42> 인간 항체의 중쇄 리더서열과 인간 항체 중쇄 $\gamma 1$ 의 불변영역 유전자는 pCMV-HKR127HC(특허등록 제 246128 호, KCTC 0531BP)를 주형으로 하고 하기 프라이머

Ryu94(서열번호: 5)와 HUR43-1(서열번호: 6), 프라이머 HUR46-1(서열번호: 9)과 HUR31(서열번호: 10)의 프라이머 세트를 각각 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)으로 합성하였다. HBV pre-S1에 대한 생쥐 모노클로날 항체인 KR127 항체의 중쇄 가변영역 유전자는 pKR127H(특허등록 제 250832 호, KCTC 0333BP)를 주형으로 하고, 하기 프라이머 HUR44-1(서열번호: 7) 및 HUR45-1(서열번호: 8)을 이용하여 PCR에 의해 합성하였다.

<43> Ryu94: 5'-GAG AAT TCA CAT TCA CGA TGT ACT TG-3'

<44> HUR43-1: 5'-CTG CTG CAG CTG GAC CTG ACT CTG GAC ACC ATT-3'

<45> HUR44-1: 5'-CAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAA CTG-3'

<46> HUR45-1: 5'-TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGC AGA GAC AGTGAC-3'

<47> HUR46-1: 5'-GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG-3'

<48> HUR31: 5'-CAG CGG CCG CTC ATT TAC CCG GGG ACA G-3' -

<49> PCR 반응 조건은 10 ng의 주형, 1 μ l의 각 프라이머(50 ppm), 0.5 μ l의 *Pfu* DNA 중합효소(Promega), 4 μ l의 2.5 mM dNTPmix 및 5 μ l의 10x *Pfu* 반응 완충용액의 반응 혼합물을 사용하여, 95 °C에서 5분 동안 예비 변성시킨 후, 95 °C에서 30초, 50 °C에서 30초, 72 °C에서 45초의 반응을 25회 수행하였다. 프라이머 Ryu94와 HUR43-1을 사용한 PCR로부터 얻어진 DNA 단편, HUR44-1과 HUR45-1을 사용한 PCR로부터 얻어진 DNA 단편 및 HUR46-1과 HUR31을 사용한 PCR로부터 얻어진 DNA 단편을 어닐링(annealing)한 후에 프라이머 Ryu94 및 HUR31을 이용한 재조합 PCR 방법으로 연결하였다. 재조합 PCR 반응조건은 상기와 같이 반응 혼합물을 준비하여 95 °C에서 5분 동안 예비 변성시킨 후, 95 °C에서

30초, 50 ℃에서 30초, 72 ℃에서 60초의 반응을 30회 수행하였으며, 72 ℃에서 5분 동안 최종 연장반응(extension)을 실시하였다.

<50> 최종적으로 합성된 카이메릭 중쇄 유전자를 *EcoRI*(GAATTC)과 *NotI*(GCGGCCGC) 제한 효소로 절단한 후 pcDdA 벡터(Invitrogen사의 pcDNA의 다중 클로닝 부위에 있는 *Apa I* 위치를 제거한 플라스미드)의 *EcoRI-NotI* 위치에 클로닝하고 pcDdA-chKR127HC로 명명하였다(도 1). 이 카이메릭 중쇄 가변영역 유전자(KR127VH)의 염기서열은 DNA 서열분석법에 의해 완전히 확인하였다(도 2).

<51> 실시예 2: 생쥐/사람 카이메릭 경쇄 유전자의 제조

<52> 인간 항체의 경쇄 리더서열과 인간 항체 경쇄의 불변영역 유전자는 pKC-dhfr-HKR127(특허공개 제 2000-33008 호, KCTC 0529BP)를 주형으로 하고 하기 프라이머 Ryu86(서열번호: 11)와 HUR48(서열번호: 12), 하기 프라이머 HUR51(서열번호: 15)과 CK1D(서열번호: 16)의 프라이머 세트를 각각 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)으로 합성하였고, KR127 항체의 경쇄 가변영역 유전자는 pKR127K(특허등록 제 250832 호, KCTC 0334BP)를 주형으로 하고, 하기 프라이머 HUR49(서열번호: 13) 및 HUR50(서열번호: 14)를 이용하여 PCR에 의해 합성하였다.

<53> Ryu86: 5'-CAA AGC TTG GAA GCA AGA TGG ATT CA-3'

<54> HUR48: 5'-CAA GAT ATC CCC ACA GGT ACC AGA TAC-3'

<55> HUR49: 5'-TGT GGG GAT ATC TTG ATG ACC CAA ACT-3'

<56> HUR50: 5'-CAC AGA TCT TTT GAT TTC CAG CTT GGT-3'

<57> HUR51: 5'-ATC AAA AGA TCT GTG GCT GCA CCA TCT-3'

<58> CK1D: 5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGG GCG
AACTCAG-3'

<59> 카이메릭 경쇄 유전자를 제조하기 위한 PCR 반응조건은 프라이머 Ryu86과 HUR48, HUR49과 HUR50 및 HUR51과 CK1D를 사용한다는 것과 PCR로부터 얻어진 DNA 단편을 어닐링 한 후 프라이머 Ryu86과 CK1D를 사용한다는 것을 제외하고는 실시예 1과 같은 방법으로 실시하였다.

<60> 최종적으로 합성된 카이메릭 경쇄 유전자를 *Hind*III(AAGCTT)와 *Xba*I(TCTAGA) 제한효소로 절단한 후 pBluescript KS의 *Hind*III-*Xba*I 위치에 클로닝하여 재조합 플라스미드를 얻었다. 다시, 이 재조합 플라스미드를 *Hind*III와 *Apa*I 제한효소로 절단하여 얻은 DNA 절편을 pCMV-dhfr 벡터(KCTC 8671P)의 *Hind*III-*Apa*I 위치에 클로닝하여 pKC-dhfr-chKR127로 명명하였다(도 3). 이 카이메릭 경쇄 가변영역 유전자(KR127VK)의 염기서열은 DNA 서열 분석법에 의해 완전히 확인하였다(도 4).

<61> 실시예 3: 카이메릭 KR127 항체의 중쇄 CDR의 알라닌 주사 돌연변이 유발

<62> KR127의 중쇄의 HCDR1(aa 31-35), HCDR2(aa 50-65), HCDR3(aa 95-102) 서열의 각 아미노산 잔기의 항원과의 결합여부를 분석하기 위하여 실시예 1에서 제조한 키메라 중쇄의 발현벡터 pcDdA-chKR127HC를 주형으로 하여 PCR 및 재조합 PCR 기법을 수행하여 CDR의 각각의 아미노산 잔기를 알라닌으로 변이시킨 유전자를 제조하였으며, 각 아미노산 잔기의 번호는 카바트 번호(Kabat number)로 지칭하였다(도 2 참조).

<63> 서열번호: 17의 정방향 프라이머(forward primer) YM001N은 키메라 중쇄 유전자의 5' 말단의 리더서열에 해당하는 서열 및 *Eco*RI 제한효소 인식서열을 포함하였고, 서열번

호: 18의 역방향 프라이머(reverse primer) YM003은 인간 중쇄 유전자의 CH1 도메인의 N-말단의 하단 부위에 해당하는 서열을 포함하고 있고, 두 프라이머로 만들어진 DNA 절편의 3' 말단에 *ApaI* 제한효소 인식서열을 포함하고 있다. 이 두 프라이머는 본 발명의 중쇄 CDR 잔기의 돌연변이체의 제조에 공통적으로 사용하였다.

<64> YM001N: 5'-CCG GAA TTC ACA TTC ACG ATG TAC TTG-3'

<65> YM003: 5'-TGC CCC CAG AGG TGC T-3'

<66> HCDR1의 31번째 아미노산 세린을 알라닌(S31A)으로 돌연변이시키기 위해 5'-말단에 대응하는 프라이머 ym257(서열번호: 19; 서열번호: 1의 염기서열에서 80번 내지 112번에 상응함)과 3'-말단에 대응하는 프라이머 YM258(서열번호: 20; 서열번호: 1의 염기서열에서 101번 내지 71번 염기에 상응함)은 HCDR1 유전자의 91번 내지 93번의 세린 코돈 AGT를 알라닌 코돈 GCT로 치환하도록 고안하였다.

<67> PCR 반응조건은 프라이머 YM001N과 YM258 및 ym257과 YM003 세트를 각각 사용한 PCR로부터 얻어진 DNA 단편들을 어닐링한 후 프라이머 YM001N과 YM003을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같은 방법으로 실시하였다.

<68> 최종적으로 합성된 돌연변이체 가변영역 유전자를 *EcoRI*과 *ApaI* 제한효소로 절단한 후 상기 실시예 1의 카이메릭 중쇄 발현벡터인 pcDdA-chKR127HC의 *EcoRI*-*ApaI* 위치에 클로닝하여 얻어진 플라스미드를 pcDdA-chKR127HC-S31A로 명명하였다. 이 돌연변이 인간화 항체 중쇄 가변영역 유전자의 DNA 염기서열은 DNA 서열분석법에 의해 완전히 확인하였다. 상기와 같은 방법을 이용하여 각각의 돌연변이체를 포함하는 벡터를 클로닝하였으며, 그 결과는 표 1에 나타냈다.

<69> 표 1에서 프라이머 위치 및 돌연변이 위치는 서열번호: 1의 염기서열을 기준으로 하였다.

<70>

【표 1】

CDR	프라이머		프라이머 위치	돌연변이 위치	변이체	벡터명
HCDR1	F	ym257	80-112	91-93	Ser(AGT)→ Ala(GCT)	pcDdA-chKR127HC-S31A
	R	YM258	101-71			
	F	ym259	83-112	94-96	Ser(TCT)→ Ala(GCT)	pcDdA-chKR127HC-S32A
	R	YM260	106-73			
	F	ym261	86-117	97-99	Trp(TGG)→ Ala(GCG)	pcDdA-chKR127HC-W33A
	R	YM262	108-76			
	F	ym263	90-118	100-102	Met(ATG)→ Ala(GCG)	pcDdA-chKR127HC-M33A
	R	YM264	111-79			
HCDR2	F	ym265	94-120	103-105	Asn(AAC)→ Ala(GCC)	pcDdA-chKR127HC-N35A
	R	ym266	112-81			
	F	YM221	139-174	148-150	Arg(CGG)→ Ala(GCC)	pcDdA-chKR127HC-R50A
	R	YM222	158-128			
	F	YM225	143-178	151-153	Ile(ATT)→ Ala(GCT)	pcDdA-chKR127HC-I51A
	R	YM226	162-131			
	F	YM227	145-180	154-156	Tyr(TAT)→ Ala(GCT)	pcDdA-chKR127HC-Y52A
	R	YM228	165-135			
	F	ym229	148-181	157-159	Pro(CCT)→ Ala(GCT)	pcDdA-chKR127HC-P52aA
	R	YM230	167-136			
	F	ym231	150-186	160-162	Gly(GGA)→ Ala(GCA)	pcDdA-chKR127HC-G53A
	R	YM232	173-145			
	F	ym233	152-188	163-165	Asp(GAT)→ Ala(GCT)	pcDdA-chKR127HC-D54A
	R	YM234	176-144			
	F	ym235	155-193	166-168	Gly(GGA)→ Ala(GCA)	pcDdA-chKR127HC-G55A
	R	YM236	178-146			
	F	ym237	158-194	169-171	Asp(GAT)→ Ala(GCT)	pcDdA-chKR127HC-D56A
	R	ym238	184-149			
	F	ym239	160-195	172-174	Thr(ACT)→ Ala(GCT)	pcDdA-chKR127HC-T57A
	R	ym240	185-150			
HCDR3	F	ym241	164-196	175-177	Asn(AAC)→ Ala(GCC)	pcDdA-chKR127HC-N58A
	R	ym242	187-150			
	F	YM207	286-317	295-297	Glu(GAG)→ Ala(GCG)	pcDdA-chKR127HC-E95A
	R	YM208	305-274			
	F	YM209	289-316	298-300	Tyr(TAC)→ Ala(GCC)	pcDdA-chKR127HC-Y96A
	R	YM210	307-276			
	F	YM211	292-318	301-303	Asp(GAC)→ Ala(GCC)	pcDdA-chKR127HC-D97A
	R	YM212	313-279			
	F	YM213	296-321	304-306	Glu(GAG)→ Ala(GCG)	pcDdA-chKR127HC-E98A
	R	YM214	315-285			
	F	YM255	303-327	310-312	Tyr(TAC)→ Ala(GGC)	pcDdA-chKR127HC-Y102A
	R	YM256	319-289			

<7> 시험예 1: 중쇄 변이체를 갖는 카이메릭 항체의 발현 및 항원 결합친화도의 측정

<72> (단계 1) 카이메릭 항체의 발현 확인

<73> COS7 세포(ATCC CRL-1651)를 송아지 혈청 10 %가 첨가된 DMEM 배양배지(GIBCO사)에 접종하여 37 °C의 5 % CO₂ 항온기에서 계대배양하였다. 얻어진 세포를 동일한 배지가 담긴 100 mm 접시에 1×10⁶ 세포를 접종하고 37 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그후, 실시예 2의 카이메릭 경쇄 발현 플라스미드 pKC-dhfr-chKR127과 실시예 3에서 얻은 각각의 중쇄 발현 플라스미드 각 5 µg씩을 OPTI-MEM I(GIBCO사) 800 µl로 희석하고, 리포펙타민(Lipofectamine, GIBCO사) 50 µl도 OPTI-MEM I 800 µl로 희석하였다. 이 희석액들을 15 ml 튜브에 넣어 섞은 다음 15분 이상 실온에서 방치하였다. 한편, 상기와 같이 배양한 COS7 세포를 OPTI-MEM I으로 3회 세척하였다. DNA-리포펙타민 혼합물에 OPTI-MEM I 6.4 ml를 가한 다음 세척한 COS7 세포 위에 골고루 섞어주었다. 5 % CO₂ 항온기에서 48 시간 동안 배양하여 얻은 상층액을 회수하였다. 그리고 나서, 항-인간 항체(anti-human IgG; Sigma)를 포획 항체(capture antibody)로 사용하고 항-인간 항체(Fc specific)에 양고추냉이 과산화수소효소(horseradish peroxidase)가 결합된 항체(PIERCE사)를 2차 항체로 사용하여 샌드위치 ELISA를 실시한 결과, 카이메릭 항체의 발현을 확인하였다.

<74> (단계 2) 항원 결합친화도 측정

<75> HBV의 재조합 항원인 GST-pre-S1(1-56)(H. S. Kim 및 H. J. Hong, *Biotechnology Letters*, 17, 871-876, 1995)을 마이크로플레이트의 각 웰에 150 ng씩 코팅한 후 단계 1에서 얻은 세포 상층액을 항체의 양이 웰당 5 ng이 되도록 첨가하였다. 상기 단계 1에서와 같은 2차 항체를 사용하여 간접 ELISA(indirect ELISA)를 수행하고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 경쟁적 ELISA 방법(competitive ELISA, Ryu 등, *J. Med. Virol.*,

52, 226, 1997)을 이용하여 각 중쇄 변이체의 항원 결합친화도(K_D)를 결정하고 원래의 카이메릭 중쇄의 항원 결합친화도와 비교하였다(표 2).

<76> 【표 2】

중쇄 CDR 변이체의 항원 결합친화도

CDR	Mutant	K_D (nM)
H1	WT	11.0 ± 1.664
	S31A	14.67 ± 2.386
	S32A	8.455 ± 0.840
	W33A	>10000
	M34A	>10000
	N35A	>10000
H2	R50A	>10000
	I51A	12.8 ± 1.05
	Y52A	276.8 ± 23.60
	P52aA	170.3 ± 5.318
	G53A	7.697 ± 0.980
	D54A	1.663 ± 0.477
	G55A	5.766 ± 0.211
	D56A	6.59 ± 1.09
	T57A	13.68 ± 4.016
	N58A	1.568 ± 0.085
	E95A	>10000
H3	Y96A	>10000
	D97A	0.57 ± 0.03
	E98A	64.2 ± 7.78
	Y102A	3.581 ± 0.457

<77> 그 결과, HCDR1의 33번, 34번, 35번 잔기가, HCDR2의 50번, 52번, 52a번 잔기가, HCDR3의 95번, 96번, 98번 잔기가 각각 알라닌으로 치환되었을 때 항원 결합친화도가 3배 이상 저해됨을 관찰하고 이 잔기들이 SDR임을 확인하였다. 그러나, HCDR3의 97번 잔기인 아스파르트산과 102번 잔기인 티로신은 알라닌으로 치환되었을 때 오히려 항원 결합친화도가 증가하였다.

<78> 실시예 4: HCDR3 변이체의 제조 및 항원 결합친화도의 분석

<79> 상기 시험예 1에서 확인된 바와 같이, HCDR3의 97번 잔기인 아스파르트산과 102번 잔기인 티로신이 알라닌으로 치환되었을 때 항원 결합친화도가 증가하였으므로, 결합력이 증가된 항체 변이체를 제조하기 위해, 중쇄 HCDR3의 97번, 98번 및 102번의 아미노산 잔기를 실시예 3의 방법과 같이 부위 특이적 돌연변이 유발(site-directed

mutagenesis)시켜 돌연변이체를 얻은 후 시험에 1과 같이 항원 결합친화도를 분석하였다

<80> (단계 1) D97 및 E98 변이체

<81> 시험에 1에서 아스파르트산을 알라닌으로 치환시킨 돌연변이체 D97A의 항원 결합친화도가 야생형보다 더 높음을 관찰하였다. 이는 97번 잔기의 음전하 아미노산 (negatively charged amino acid)이 항원결합에 중요하지 않음을 시사하는 것이다. 따라서 97번 잔기를 양전하 아미노산(positively charged amino acid)인 아르기닌으로 치환하거나 알라닌과 같은 중성 아미노산인 발린으로 치환시켜 이 변이체들의 항원 결합친화도를 측정하였다. 또한, 98번 글루탐산 잔기를 아르기닌 또는 발린으로 치환하였다. 이러한 돌연변이체를 포함하는 벡터는 표 3과 같다.

<82> 【표 3】

CDR	프라이머		프라이머 위치	돌연변이 위치	변이체	벡터명
HCDR3	R	P1	312-279	301-303	Asp(GAC)→	pcDdA-chKR127HC-D97R
	F	P2	295-326		Arg(CGG)	
	R	P3	312-279	301-303	Asp(GAC)→	pcDdA-chKR127HC-D97V
	F	P4	295-326		Val(GTT)	
	R	P5	312-279	304-306	Glu(GAG)→	pcDdA-chKR127HC-E98R
	F	P6	295-326		Arg(CGG)	
	R	P7	312-279	304-306	Glu(GAG)→	pcDdA-chKR127HC-E98V
	F	P8	295-326		Val(GTT)	

<83> D97R 또는 D97V의 중쇄를 포함하는 벡터와 실시예 2에서 제조된 야생형 카이메릭 중쇄를 포함하는 벡터 pKC-dhfr-chKR127을 시험에 1에서와 같이 COS7 세포주에서 발현시켜 항원 결합친화도를 측정한 결과,

도 5에서와 같이 D97R의 항원 결합친화도가 야생형보다 3배 이상 높았고 D97V는 야생형보다 높았으나 D97R보다는 높지 않았다. 또한, E98R은 야생형보다 항원 결합친화도가 낮았지만 E98V는 4배 정도 높게 나타났다.

<84> (단계 2) D97R/E98V

<85> 상기 단계 1에서 항원 결합친화도를 증가시키는 것으로 밝혀진 D97R과 E98V 돌연변이체를 동시에 갖는 변이체를 제조하여 그 항원 결합친화도를 확인하였다.

<86> D97R의 돌연변이체 유전자를 포함하는 벡터 pcDdA-chKR127HC-D97R을 주형(template)으로 사용하고 E98V의 돌연변이체를 제조하기 위해 사용한 프라이머인 P7 및 P8을 사용하여 PCR을 수행하여 D97R/E98V 돌연변이체를 제조하였다. 이 돌연 변이체의 항원 결합친화도는 야생형에 비해 15배 높게 나타났다(도 5).

<87> (단계 3) D97R/E98V/Y102A

<88> D97R/E98V의 돌연변이체 유전자를 포함하는 벡터 pcDdA-chKR127HC-RV를 주형으로 사용하고 실시예 3에서 Y102A의 돌연변이체를 제조하기 위하여 사용한 프라이머인 YM255 및 YM256을 사용하여 PCR을 수행하여 얻은 D97R/E98V/Y102A 돌연변이체(RVAA라고 명명함)의 항원 결합친화도를 측정한 결과, D97R/E98V 돌연변이체와 거의 비슷하였다(도 5).

<89> (단계 4) D97R/E98V/Y102E 및 D97R/E98V/Y102R

<90> D97R/E98V 돌연변이체 유전자를 포함하는 벡터 pcDdA-chKR127HC-RV를 주형으로 사용하고 표 4의 프라이머 P17과 P18 및 P19와 P20을 사용하여 PCR을 수행하여

D97R/E98V/Y102E 돌연변이체(RVAE라고 명명함) 및 D97R/E98V/Y102R 돌연변이체(RVAR이라고 명명함)를 제조하였다. 이 돌연변이체를 포함하는 벡터는 표 4와 같다.

- <91> 상기에서 제조된 돌연변이체의 항원 결합친화도를 조사한 결과, RVAE는 D97R/E98V/Y102A 돌연변이체와 거의 비슷하였으나, RVAR은 D97R/E98V/Y102A보다 다소 높았다(도 5).

<92> 【표 4】

	프라이머		프라이머 위치	돌연변이 위치	변이체	벡터명
HCDR3	R	P17	312-279	307-309	Tyr(TAC)→ Glu(GAG)	pcDdA-chKR127HC-RVAE
	F	P18	295-326			
	R	P19	312-279	307-309	Tyr(TAC)→ Arg(CGT)	pcDdA-chKR127HC-RVAR
	F	P20	295-326			

<93> 시험예 2: HCDR3의 변이체인 RVAR의 항원 결합친화도의 측정

- <94> 실시예 4의 단계 4에서 얻은 RVAR 돌연변이체의 항원 결합친화도를 정확하게 측정하기 위하여 경쟁적 ELISA 방법을 이용하여 항원 결합친화도를 결정하였다. 실시예 4의 단계 4에서 얻은 플라스미드와 실시예 2의 카이메릭 경쇄 발현 플라스미드 (pKC-dhfr-chKR127)를 COS7 세포에 형질감염시켜서 생산한 카이메릭 항체 5 ng과 pre-S1 항원(1×10^{-7} 내지 1×10^{-12} M)을 미리 37 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 반응 혼합물을 pre-S1 항원으로 코팅한 96웰 마이크로플레이트의 각 웰에 가하여 37 °C에서 30 분 동안 반응시킨 후 실시예 4와 같은 방법으로 ELISA를 수행하였다. 대조군으로 실시예 1의 카이메릭 중쇄 및 경쇄 발현 플라스미드인 pcDdA-chKR127HC와 pKC-dhfr-chKR127을 형질감염시킨 COS7 세포로부터 얻은 카이메릭항체(chKR127)를 사용하였다. RVAR 항체의

항원 결합친화도는 약 1.8×10^{-10} M으로서 chKR127의 결합친화도인 8.2×10^{-9} M과 비교하였을 때 항원 결합친화도가 약 45배 높다는 것을 확인하였다.

<95> 실시예 5: 생쥐 모노클로날 항체 KR127의 경쇄 CDR의 알라닌 주사 돌연변이유발

<96> KR127의 경쇄 LCDR1(aa 24-34), LCDR2(aa 50-60), LCDR3(aa 89-97) 서열의 각 아미노산 잔기의 항원과의 결합친화도를 분석하기 위하여 키메라 경쇄의 발현벡터 pKC-dhfr-chKR127을 주형으로 하여 PCR 및 재조합 PCR 기법을 수행하여 각각의 아미노산 잔기를 알라닌으로 변이시킨 유전자를 제조하였으며, 각 아미노산 잔기의 번호는 카바트 번호로 지칭하였다.

<97> 하기 정방향 프라이머 YM004(서열번호: 21)는 키메라 경쇄 유전자의 5' 말단의 리더서열에 해당하는 서열 및 *Hind*III 제한효소 인식서열을 포함하였고, YM009(서열번호: 22)는 인간 경쇄 유전자의 불변 영역의 N-말단 부위에 대한 역방향 프라이머로서 제한효소 *Bst*NI(CGTACG)의 인식서열을 포함하고 있다. 이 두 프라이머들은 본 발명의 경쇄 CDR 잔기의 돌연변이체의 제조에 공통적으로 사용되었다.

<98> YM004: 5'-CCA AAG CTT GGA AAG ATG GAT TCA CAG-3'

<99> YM009: 5'-GCA GCC ACC GTA CGT TTG ATT TCC ACC TTG GT-3'

<100> LCDR1의 26번째 아미노산 잔기인 세린을 알라닌(S26A)으로 돌연변이시키기 위해 정방향 프라이머 YM135와 역방향 프라이머 YM136은 LCDR1 유전자의 76번 내지 78번의 세린 코돈 AGT를 알라닌 코돈 GCT로 치환하도록 고안하였다.

- <101> PCR 반응조건은 프라이머 YM004와 YM 135 및 YM 136과 YM009를 사용한 PCR로부터 얻어진 DNA 단편을 어닐링하여 프라이머 YM004과 YM009를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 같은 방법으로 실시하였다.
- <102> 최종적으로 합성된 돌연변이체 가변영역 유전자를 *Hind*III와 *Bsi*WI 제한효소로 절단한 후, 실시예 2의 카이메릭 경쇄 발현벡터인 pKC-dhfr-chKR127의 *Hind*III-*Bsi*WI 위치에 클로닝하고 pKC-dhfr-chKR127BS-S26A로 명명하였다. 이 돌연변이 카이메릭 경쇄 가변영역 유전자의 DNA 염기서열은 DNA 서열분석법에 의해 완전히 확인하였다. 상기와 같은 방법을 실시하여 각각의 돌연변이체를 포함하는 벡터를 클로닝하였으며, 그 결과는 표 5에 나타냈다. 표 5에서 프라이머 위치 및 돌연변이 위치는 서열번호: 3의 염기서열을 기준으로 하였다.
- <103>

1020020015708

【표 5】

	프라이머		프라이머 위치	돌연변이 위치	변이체	백터명
LCDR1	F	YM135	67-102	76-78	Ser(AGT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-S26A
	R	YM136	86-54			
	F	YM137	69-107	79-81	Gln(CAG)- Ala(GCG)	pKC-dhfr-chKR127BS-Q27A
	R	YM138	91-56			
	F	YM139	70-111	82-84	Ser(AGC)- Ala(GCC)	pKC-dhfr-chKR127BS-S27aA
	R	YM140	94-58			
	F	YM141	73-114	85-87	Leu(CTC)- Ala(GCC)	pKC-dhfr-chKR127BS-L27bA
	R	YM142	98-64			
	F	YM143	73-116	88-91	Leu(TTA)- Ala(GCA)	pKC-dhfr-chKR127BS-L27cA
	R	YM144	102-68			
	F	YM145	79-118	91-93	Tyr(TAT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-Y27dA
	R	YM146	103-69			
	F	YM147	83-119	94-96	Ser(AGT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-S27eA
	R	YM148	107-69			
	F	YM149	84-120	97-99	Asn(AAT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-N28A
	R	YM150	110-70			
	F	YM151	88-127	100-102	Gly(GGA)- Ala(GCA)	pKC-dhfr-chKR127BS-G29A
	R	YM152	114-74			
	F	YM153	91-130	103-105	Lys(AAA)- Ala(GCA)	pKC-dhfr-chKR127BS-K30A
	R	YM154	116-77			
	F	YM155	93-132	106-108	Thr(ACC)- Ala(GCC)	pKC-dhfr-chKR127BS-T31A
	R	YM156	118-80			
	F	YM103	99-133	109-111	Tyr(TAT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-Y32A
	R	YM104	120-83			
	F	N34A-F	106-132	115-118	ASn(AAT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-Y34A
	R	N34A-R	126-100			

1020020015708

<104>

	프라이머		프라이머 위치	돌연변이 위치	변이체	벡터명
LCDR2	F	YM129	151-188	163-165	Leu(CTG)- Ala(GCG)	pKC-dhfr-chKR127BS-L50A
	R	YM130	175-140			
	F	YM131	153-191	166-168	Val(GTG)- Ala(GCG)	pKC-dhfr-chKR127BS-V51A
	R	YM132	179-145			
	F	YM133	157-192	169-171	Ser(TCT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-S52A
	R	YM134	181-147			
	F	K53A-F	163-187	172-174	Lys(AAA)- Ala(GCA)	pKC-dhfr-chKR127BS-K53A
	R	K53A-R	178-154			
	F	L54A-F	163-189	175-177	Leu(CTG)- Ala(GCG)	pKC-dhfr-chKR127BS-L54A
	R	L54A-R	180-159			
	F	D55A-F	170-195	178-180	Asp(GAC)- Ala(GCC)	pKC-dhfr-chKR127BS-D55A
	R	D55A-R	184-163			
	F	K56A-F	175-198	181-183	Ser(TCT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-S56A
	R	K56A-R	190-168			
LCDR3	F	YM113	270-304	280-282	Val(GTG)- Ala(GCG)	pKC-dhfr-chKR127BS-V89A
	R	YM114	292-258			
	F	YM115	274-307	283-285	Gln(CAA)- Ala(GCA)	pKC-dhfr-chKR127BS-Q90A
	R	YM116	294-259			
	F	YM117	277-310	286-288	Gly(GGT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-G91A
	R	YM118	296-265			
	F	YM119	281-310	289-291	Thr(ACA)- Ala(GCA)	pKC-dhfr-chKR127BS-T92A
	R	YM120	302-266			
	F	YM121	282-313	292-294	His(CAT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-H93A
	R	YM122	304-271			
	F	YM111	286-314	295-297	Phe(TTT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-F94A
	R	YM112	307-274			
	F	YM123	286-317	298-300	Pro(CCT)- Ala(GCT)	pKC-dhfr-chKR127BS-P95A
	R	YM124	308-278			
	F	YM125	292-319	301-303	Gln(CAG)- Ala(GCG)	pKC-dhfr-chKR127BS-Q96A
	R	YM126	311-279			
	F	YM127	294-320	304-306	Thr(ACG)- Ala(GCG)	pKC-dhfr-chKR127BS-T97A
	R	YM128	313-282			

<105> 시험예 3: 경쇄 돌연변이체의 항원 결합친화도의 측정

<106> 실시예 5의 각 경쇄 돌연변이체를 갖는 플라스미드와 야생형 카이메릭 KR127 중쇄 플라스미드인 pcDdA-chKR127HC을 시험예 1과 같이 COS7 세포에서 발현시키고 각각의 항원 결합친화도를 측정하였다. 그 결과는 표 6에 나타난 것과 같으며, 항원 결합친화도가 3 배 이상 저해된 것을 SDR로 판정하여 LCDR1의 27b, 27d, 27e, 28, 30, 32 및 34번 잔

기, LCDR2의 50 및 55번 잔기, 및 LCDR3의 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 및 96번 잔기가 SDR임을 확인하였다.

<107> 【표 6】

경쇄 CDR 변이체의 항원결합친화도 분석 결과

CDR	mutant	K_D (nM)
L1	S26A	6.49 ± 0.244
	Q27A	14.2 ± 2.29
	S27aA	37.9 ± 6.66
	L27bA	>10000
	L27cA	36.8 ± 11.01
	Y27dA	1032.7 ± 56.1
	S27eA	>10000
	N28A	>10000
	G29A	23.94 ± 2.62
	K30A	>10000
	T31A	13.19 ± 1.98
	Y32A	>10000
	Y34A	>10000
L2	L50A	159.4 ± 21.37
	V51A	37.00 ± 10.33
	S52A	14.08 ± 0.509
	K53A	7.928 ± 0.976
	L54A	12.57 ± 2.453
	D55A	225.2 ± 2.970
	S56A	12.95 ± 0.367
L3	V89A	121.2 ± 4.62
	Q90A	>10000
	G91A	>10000
	T92A	74.2 ± 2.90
	H93A	54.5 ± 4.48
	F94A	>10000
	P95A	>10000
	Q96A	293.6 ± 7.13
	T97A	17.3 ± 2.56

<108> 실시예 6: SDR-이식방법에 의한 인간화 중쇄의 제조

<109> 인간화 중쇄를 제조하기 위해 KR127 중쇄 가변영역과 아미노산 서열이 유사한 인간 면역글로불린 세포주 VH 유전자 단편인 DP7(immunoglobulin germline VH gene segment DP7, Tomlinson 등, *J. Mol. Biol.*, 227, 776-798, 1992)과 인간 면역글로불린 세포주 JH4 단편(Ravetch 등, *Cell*, 27, 583-591, 1981)을 인간 중쇄(DP7-JH4)로 사용하였다.

<110> HCDR1의 SDR인 33번, 34번, 35번 잔기 중 DP7의 34번 잔기인 메티오닌이 KR127 중쇄와 동일하여 이식하지 않고 33번(트립토판), 35번(아스파라진) 잔기를 DP7에 이식하였다. 그리고 DP7의 32번 잔기에 티로신이 존재할 경우 항원 결합친화도가 감소하는 것을

관찰하여, KR127 HCDR1의 서열과 가장 유사한 인간 항체 HCDR1(Gen Bank data base 75023 (SAWMN))의 32번에 존재하는 알라닌 잔기를 이식하였다.

- <111> HCDR2의 SDR인 50번, 52번, 52a번 잔기 중에서 KR127과 DP7의 52a번 프롤린은 동일하여 이식하지 않고 50번 아르기닌과 52번 티로신 잔기를 DP7에 이식하였다.
- <112> HCDR3의 SDR인 95번 글루탐산, 96번 티로신 잔기와, KR127 항체의 항원 친화도가 증가된 아미노산인 97번 아르기닌, 98번 발린, 102번 아르기닌 잔기를 포함하는 HCDR3 서열인 EYRVAR을 인간 중쇄 DP7에 이식하였다.
- <113> 또한, KR127 항체의 중쇄 가변영역에서 CDR 루프(CDR loop)의 형태(conformation)에 영향을 주는 골격구조 3(framework region 3(FR 3))의 71번 잔기인 알라닌과 73번 잔기인 리신을 DP7-JH4에 이식하였다.
- <114> SDR과 FR 3의 아미노산 잔기를 DP7-JH4에 이식하여 얻은 인간화 중쇄 가변영역 유전자를 프라이머 Ryu166(서열번호: 23)과 Hur37(서열번호: 24)을 사용하여 실시예 3과 같이 PCR 및 재조합 PCR을 실시하여 제조하였고 HuKR127VH-VII이라 명명하였다.
- <115> Ryu 166: 5'-GGA TTT GTC TGC AGT CAT TGT GGC TCT GCC CTG GAA CTT-3'
- <116> Hur 37: 5'-GAC AAA TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG-3'
- <117> 이 인간화 항체 중쇄 가변영역 유전자는 DNA 염기서열을 분석하여 완전히 확인하였다(도 2). 그리고 나서, 이 유전자를 *EcoRI*과 *ApaI* 제한효소로 절단한 후 발현벡터인 pcDdA-chKR127HC의 *EcoRI*-*ApaI* 위치에 클로닝하여 얻은 발현벡터를 pHuKR127HC라고 명명하였다. 상기 인간화 중쇄와 특허등록 제 246128 호에 개시된 인간화 항체 HZKR127I 경쇄로 조합된 인간화 항체의 항원 결합친화도를 시험예 2의 방법에 따라 조사한 결과, 이

인간화 항체의 항원 결합친화도는 1.5×10^{-10} M로서 대조군인 인간화 항체 HZKR127I의 친화도인 8.2×10^{-9} M과 비교하여 약 50배가 높음을 확인하였다.

<118> 실시예 7: SDR-이식방법에 의한 인간화 경쇄의 제조

- <119> 인간화 경쇄를 제조하기 위하여, KR127 경쇄 가변영역과 아미노산 서열이 유사한 인간 면역글로불린 세포주 VK 유전자 단편인 DPK12(Cox 등, *Eur. J. Immunol.*, 24, 827-836, 1994)와 인간 면역글로불린 세포주 JK4(Hieter 등, *J. Biol. Chem.*, 257, 1516-1522, 1982,) 유전자 단편을 인간 경쇄(DPK12-JK4)로 사용하여 시험예 4에서 확인한 SDR을 PCR 및 재조합 PCR을 이용하여 각각 DPK12-JK4에 이식하였다.
- <120> LCDR1의 SDR인 27b, 27d, 27e, 28, 30, 32 및 34번 잔기 중 27b, 27e, 30 및 32번 잔기는 KR127 경쇄와 DPK12가 동일하므로 27d번 티로신, 28번 아스파라진 및 34번 아스파라진 잔기를 DPK12에 이식하였다.
- <121> LCDR2의 SDR인 50 및 55번 잔기 중 50번 류신 및 55번 아스파르트산 잔기를 DPK12에 이식하였다.
- <122> LCDR3의 SDR인 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 및 96번 잔기 중 90번 글루타민 및 95번 프롤린 잔기가 DPK12와 동일하므로, 89번 발린, 91번 글리신, 92번 트레오닌, 93번 히스티딘, 94번 페닐알라닌 및 96번 글루타민 잔기를 인간 경쇄 DPK12에 이식하였다.
- <123> 또한, KR127 항체의 경쇄 가변영역에서 중쇄와의 작용이나 CDR 잔기와의 상호작용에 중요하게 작용하는 골격구조 2(FR 2)의 36번 류신 및 46번 아르기닌 잔기를 DPK12-JK4에 이식하였다.

1020020015708

<124> SDR과 FR 2의 아미노산 잔기들을 DPK12-JK4에 이식한 인간화 경쇄 가변영역 유전자를 프라이머 Ryu118(서열번호: 25)과 Ryu119(서열번호: 26)를 이용하여 실시예 3과 같이 PCR 및 재조합 PCR을 실시하여 제조하였고 HuKR127VL-IV라고 명명하였다.

<125> Ryu 118: 5'-CTG TGG AGG CTG GCC TGG CTT CTG TAA TAA CCA-3'

<126> Ryu 119: 5'-GGC CAG CCT CCA CAG CTC CTA ATC TAT CTG-3'

<127> 이 인간화 항체 경쇄 가변영역 유전자의 DNA 염기서열은 DNA 서열분석법에 의해 완전히 확인하였다(도 4의 HZIV). 그리고 나서, 이 유전자를 *Hind*III와 *Bsi*WI 제한효소로 절단한 후 발현벡터인 pKC-dhfr-chKR127BS의 *Hind*III-*Bsi*WI 위치에 클로닝하고 pHuKR127KC로 명명하였고, 이 인간화 항체 경쇄/HZKR127I 중쇄로 조합된 인간화 항체의 항원 결합친화도는 8.4×10^{-9} M로서 대조군인 인간화 항체 HZKR127I의 친화도인 8.2×10^{-9} M과 비교하여 거의 동일함을 확인하였다.

<128> 실시예 8: SDR 이식방법에 의해 제조된 인간화 중쇄 및 인간화 경쇄로 이루어진 인간화 항체의 항원 결합친화도의 측정

<129> 인간화 중쇄 플라스미드 pHuKR127HC 및 인간화 경쇄 플라스미드 pHuKR127KC로부터 HuKR127의 중쇄 및 경쇄 유전자를 동시에 포함하는 발현플라스미드를 제조하기 위하여, 인간화 항체의 발현을 위한 카세트 벡터인 pdCMV-dhfrC-HAV6(특허출원 제 2001-0047443 호, KCTC 10028BP)의 *Eco*RI-*Apa*I 위치와 *Hind*III-*Bsi*WI 위치에 pHuKR127HC의 인간화 중쇄 가변영역 유전자를 포함하는 *Eco*RI-*Apa*I 절편과 pHuKR127KC의 인간화 경쇄 가변영역 유전자를 포함하는 *Hind*III-*Bsi*WI 절편을 각각 삽입하였다. 그 결과, 제조된 발현 플라스미드를 pdCMV-dhfrC-HuKR127이라 명명하였다(도 6). 상기 플라스미드로 형질전환된 대장균

DH5 α /pdCMV-dhfrC-HuKR127은 2002년 3월 13일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(기탁번호: KCTC 10198BP).

- <130> 본 발명의 인간화 항체의 발현 세포주를 제조하기 위하여, 발현 플라스미드 pdCMV-dhfrC-HuKR127로 *dhfr*유전자가 결여된 CHO(chinese hamster ovary)세포를 형질전환시켰다.
- <131> 우선, CHO 세포(ATCC CRL 9096)를 소 태아 혈청이 10 % 첨가된 DMEM/F12 배양배지(GIBCO)에 접종하여 37 °C의 5 % CO₂ 항온기에서 계대배양하였다. 상기 세포를 60 mm 배양접시에 5 x 10⁵ 세포로 접종하고 37 °C에서 밤새 배양한 후 OPTI-MEM I(GIBCO) 용액으로 3회 세척하였다. 한편, 상기의 항체 발현벡터 pdCMV-dhfrC-HuKR127 5 μ g를 취하여 OPTI-MEM I 500 μ l로 희석하였고, 25 μ l의 리포펙타민(lipofectamine, GIBCO)도 동일하게 OPTI-MEM I 500 μ l로 희석하였다. 상기 항체 발현벡터와 리포펙타민 희석액을 15 ml 튜브에 혼합하여 DNA-리포펙타민 혼합물을 제조한 후 이를 15분 이상 실온에서 방치하였다. 상기 각각의 DNA-리포펙타민 혼합물에 2 ml의 OPTI-MEM I을 첨가하였고 이를 깨끗이 세척된 CHO 세포에 골고루 혼합한 후 37 °C의 5 % CO₂ 항온기에서 6시간 동안 방치한 후, 20 % 소태아혈청을 포함한 DMEM/F12를 3 ml 첨가하여 다시 48시간 동안 배양하였다.
- <132> 형질전환된 세포주를 얻기 위해 상기 CHO 세포들을 트립신(trypsin)으로 떼어낸 후, G418(Gibco BRL, 550 mg/l)을 포함하는 10 % 투석된 소태아혈청의 α -MEM 배지(GIBCO)에서 약 2주 동안 배양하였다. 이 배지에서 콜로니를 형성하는 형질전환된 클론들을 각각 배양하여 항체 생산능을 확인한 후, 20 nM MTX를 포함하는 10 % 투석된 소태아혈청의 α -MEM 배지에서 배양하여 항체 유전자의 증폭을 유도하였다. 이들 클론 중에서 항체 생산성이 가장 우수한 세포주를 하나 선택하여 배양하고 CHO/HuKR127이라 명명하였다. 세

포주 CHO/HuKR127은 2002년 3월 13일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(기탁번호: KCTC 10199BP).

<133> 본 발명의 HuKR127 인간화 항체의 항원 결합친화도를 분석하기 위하여, 상기 세포주를 무혈청 배지(CHO-SFMII, GIBCO)에서 대량 배양한 후, 프로테인 G-세파로즈 4B 컬럼(Pharmacia사 제품)에 통과시켰으며, 컬럼에 결합된 항체를 0.1 M 글리신 용액(pH 2.7)으로 용출시킨 후 1.0 M 트리스 용액(pH 9.0)으로 중화시키고 PBS 완충용액(pH 7.0)에서 투석하였다. 정제된 항체를 사용하여 시험에 2와 같은 방법을 실시하여 경쟁적 ELISA를 수행한 결과, 인간화 항체 HuKR127의 항원 결합친화도는 약 1.6×10^{-10} M로서 대조군인 인간화 항체 HZKR127I의 친화도인 8.2×10^{-9} M과 비교하여 약 50배가 높음을 확인하였다 (도 7).

<134> 실시예 9: SDR 이식방법에 의해 제조된 인간화 항체의 인체 면역반응 유발 가능성 예측

<135> 보조 T 세포(helper T cell)는 면역반응 초기에 필수적으로 작용하고, MHC(major histocompatibility complex) class II는 T 세포의 선별(selection)과 활성화(activation)에 중심적인 역할을 한다. MHC class II는 단백질 항원으로부터 절단된 9개의 아미노산으로 구성되는 펩티드에 결합하여 항원제시세포(antigen-presenting cell)의 표면에서 발현 (display)되고, 이들을 인식한 TCR(T cell receptor)과 복합체를 형성하여 T 세포가 활성화되면 면역반응이 시작된다(Germain, R. N. *Cell*, 76, 287-299, 1994).

<136> 본 발명에 의해 제조된 인간화 항체(HuKR127)의 HAMA 반응 유발이 원래의 인간화 항체(HzKR127I)보다 감소될 것인지를 분석하기 위하여, 상기 두 인간화 항체

들의 중쇄 및 경쇄 가변영역에 MHC class II와 결합하는 펩티드 서열의 존재 유무를 Sturniolo 등의 방법(TEPITOPE)을 이용하여 분석하였다(Sturniolo et al., , 17, 555-561, 1999).

<137> 표 7은 본 발명의 HuKR127 및 HzKR127I의 중쇄 가변영역에서 발견되는 MHC class II-결합 펩티드 서열을 분석한 결과이고, 표 8은 HuKR127 및 HzKR127I의 경쇄 가변영역에서 발견되는 MHC class II-결합 펩티드 서열을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

<138> 표 7 및 표 8에서와 같이, 본 발명의 인간화 항체 HuKR127은 HzKR127I 보다 MHC class II에 결합하는 펩티드 서열의 수가 더 적은 것으로 나타났다. 따라서, HuKR127의 인체 내에서의 HAMA 반응은 HzKR127보다 훨씬 줄어들 것으로 예측된다. 또한 HuKR127의 항원 결합능이 HzKR127I보다 더 우수하기 때문에 B형 간염 바이러스 감염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

<139>

1020020015708

【표 7】

인간화 중쇄의 TEPITOPE 분석 결과

항체	HzKR127I		HuKR127	
	펩티드 서열	MHC class II	펩티드 서열	MHC class II
MHC class II -결합 펩티드	LVQSGAEVV	DRB1_0306 DRB1_0307 DRB1_0308 DRB1_0311 DRB1_0421 DRB1_0701 DRB1_0703	LVQSGAEVK	0
	VKPGASVKV	DRB1_0102	KKPGASVKV	0
	FSSSWMNWV	DRB1_0703	FTSAWMNVV	0
	WIGRIYPGD	DRB1_0801 DRB1_0817	WMGRIYPSG	0
	FQ GKATLTA	DRB1_0401 DRB1_0402 DRB1_0405 DRB1_0408 DRB1_0421 DRB1_0426 DRB1_0801 DRB1_0802 DRB1_0804 DRB1_0806 DRB1_0813 DRB1_0817 DRB1_1101 DRB1_1102 DRB1_1104 DRB1_1106 DRB1_1114 DRB1_1120 DRB1_1121 DRB1_1128 DRB1_1302 DRB1_1305 DRB1_1307 DRB1_1311 DRB1_1321 DRB1_1322 DRB1_1323	FQGRVTMTA	DRB1_0305 DRB1_0401 DRB1_0402 DRB1_0408 DRB1_0426 DRB1_0801 DRB1_0802 DRB1_0804 DRB1_0806 DRB1_0813 DRB1_0817 DRB1_1101 DRB1_1114 DRB1_1120 DRB1_1128 DRB1_1302 DRB1_1305 DRB1_1307 DRB1_1321 DRB1_1323 DRB1_1502
	YWGQGTLLVT	DRB1_0401 DRB1_0405 DRB1_0421 DRB1_0426	RWGQGTLLVT	0
	IGRIYPGDG	DRB5_0101 DRB5_0105	MGRIYPSGG	DRB1_0404 DRB1_0405 DRB1_0410 DRB1_0423
	YAQKFQGA	DRB1_0802	YAQKFQGRV	0
	VYFCAREYD	DRB1_1304	VYFCAREYR	DRB1_0301
	YWGQGTLLVT	DRB1_0401 DRB1_0405 DRB1_0421 DRB1_0426	RWGQGTLLVT	0
	총계	50		26

【표 8a】

인간화 경색의 TEPITOPE 분석결과

항	HzKR127-I		HuKR127	
	펩티드 서열	MHC class II	펩티드 서열	MHC class II
MHC class II-결합 펩티드	ILMTQTPLS	DRB1_0301 DRB1_0305 DRB1_0306 DRB1_0307 DRB1_0308 DRB1_0309 DRB1_0311 DRB1_0401 DRB1_0402 DRB1_0404 DRB1_0405 DRB1_0408 DRB1_0410 DRB1_0421 DRB1_0423 DRB1_0426 DRB1_0804 DRB1_1101 DRB1_1102 DRB1_1104 DRB1_1106 DRB1_1107 DRB1_1114 DRB1_1121 DRB1_1128 DRB1_1301 DRB1_1304 DRB1_1305 DRB1_1307 DRB1_1311 DRB1_1321 DRB1_1322 DRB1_1323 DRB1_1327 DRB1_1328	IVMTQTPLS	0
	LMTQTPLSL	DRB1_0101 DRB1_0102 DRB1_1304	VMTQTPLSL	0
	WLLQKPGQS	DRB1_0101 DRB1_0305 DRB1_0309 DRB1_0401 DRB1_0408 DRB1_0421 DRB1_0426 DRB1_0802 DRB1_1101 DRB1_1107 DRB1_1114 DRB1_1120 DRB1_1128 DRB1_1302 DRB1_1305 DRB1_1307 DRB1_1321 DRB1_1323 DRB5_0101 DRB1_0105	WLLQKPGQP	0
	YYCVQGTHF	DRB1_0101 DRB1_0701 DRB1_0703 DRB5_0101 DRB5_0105	YYCVQGTHF	DRB1_0101 DRB1_0701 DRB1_0703 DRB5_0101 DRB5_0105
	YCVQGTHFP	DRB1_0401 DRB1_0421 DRB1_0426	YCVQGTHFP	DRB1_0401 DRB1_0421 DRB1_0426

출력 일자: 2003/2/15

1020020015708

<141>

【표 8b】

항 목	HzKR127-I		HuKR127	
	펩티드 서열	MHC class II	펩티드 서열	MHC class II
MHC class II-결합 펩티드	ILMTQTPLS	DRB1_0301 DRB1_0305 DRB1_0306 DRB1_0307 DRB1_0308 DRB1_0309 DRB1_0311 DRB1_0401 DRB1_0402 DRB1_0404 DRB1_0405 DRB1_0408 DRB1_0410 DRB1_0421 DRB1_0423 DRB1_0426 DRB1_0804 DRB1_1101 DRB1_1102 DRB1_1104 DRB1_1106 DRB1_1107 DRB1_1114 DRB1_1121 DRB1_1128 DRB1_1301 DRB1_1304 DRB1_1305 DRB1_1307 DRB1_1311 DRB1_1321 DRB1_1322 DRB1_1323 DRB1_1327 DRB1_1328	IVMTQTPLS	0
	LMTQTPLSL	DRB1_0101 DRB1_0102 DRB1_1304	VMTQTPLSL	0
	WLLQKPGQS	DRB1_0101 DRB1_0305 DRB1_0309 DRB1_0401 DRB1_0408 DRB1_0421 DRB1_0426 DRB1_0802 DRB1_1101 DRB1_1107 DRB1_1114 DRB1_1120 DRB1_1128 DRB1_1302 DRB1_1305 DRB1_1307 DRB1_1321 DRB1_1323 DRB5_0101 DRB1_0105	WLLQKPGQP	0
	YCVQGTHF	DRB1_0101 DRB1_0701 DRB1_0703 DRB5_0101 DRB5_0105	YCVQGTHF	DRB1_0101 DRB1_0701 DRB1_0703 DRB5_0101 DRB5_0105
	YCVQGTHFP	DRB1_0401 DRB1_0421 DRB1_0426	YCVQGTHFP	DRB1_0401 DRB1_0421 DRB1_0426

【발명의 효과】

<142> 본 발명은 SDR 이식방법에 의한 B형 간염바이러스 pre-S1에 대한 인간화 항체의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 인간화 항체는 기존의 인간화 항체(HZKR127)보다 HAMA 반응을 더 줄일 수 있으면서 항원 결합친화도가 증가되어 HBV에 감염된 환자를 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

(a) 생쥐 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄의 상보성 결정부위(complementarity determining region, CDR) 중에서 특이 결정잔기(specificity determining residue, SDR)를 확인하는 단계, 및

(b) 단계 (a)에서 확인된 SDR의 각 아미노산 잔기를 하나 이상 인간 항체의 가변영역의 대응 아미노산 위치에 이식하는 단계를 포함하는 인간화 항체의 제조 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

단계 (a)에서 CDR 내의 각 아미노산 잔기를 독립적으로 알라닌으로 치환하여 얻은 알라닌 치환 변이체의 항원 결합친화도(K_D)를 측정함으로써 변이체의 친화도를 원래 항체의 친화도보다 감소하게 한 아미노산 잔기를 특이 결정잔기(SDR)로 결정하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체의 제조 방법.

【청구항 3】

제 2항에 있어서,

B형 간염바이러스 pre-S1 항원에 대한 생쥐 모노클로날 항체인 KR127 항체의 중쇄(서열 번호: 2)의 CDR인 HCDR1(aa 31-35), HCDR2(aa 50-65) 및 HCDR3(aa 95-100) 및 경쇄(서열 번호: 4)의 CDR인 LCDR1(aa 24-34), LCDR2(aa 50-56) 및 LCDR3(aa 89-97)의 각각의 아미노산 잔기를 알라닌으로 치환한 변이체의 항원 결합친화도(K_D)를 측정함으로써 변이체의 친화도를 원래 항체의 친화도보다 3배 이상 감소하게 한 아미노산 잔기를 특이 결정잔

기(SDR)로 결정하고, SDR을 인간 항체의 중쇄 및 경쇄의 대응 아미노산과 비교하여 인간 항체에 이식하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【청구항 4】

제 3항에 있어서,

KR127 항체의 중쇄의 HCDR1(aa 31-35)에서 33번 트립토판, 34번 메티오닌 및 35번 아스파라긴, HCDR2(aa 50-65)에서 50번 아르기닌, 52번 티로신 및 52a번 프롤린, 및 HCDR3(aa 95-100)에서 95번 글루탐산, 96번 티로신 및 98번 글루탐산 잔기 중 어느 하나 이상의 잔기를 인간 항체의 중쇄의 대응 아미노산과 비교하여 인간 항체에 이식하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【청구항 5】

제 4항에 있어서,

KR127 항체의 중쇄의 SDR 아미노산 잔기가 이식된 인간 항체 중쇄에 다음의 치환을 하나 이상 도입하는 것을 특징으로 하는 제조 방법:

KR127 항체의 중쇄의 HCDR1 32번 잔기에 해당하는 아미노산을 알라닌으로 치환,

KR127 항체의 중쇄의 HCDR3 97번 잔기에 해당하는 아미노산을 아르기닌 또는 알라닌으로 치환,

KR127 항체의 중쇄의 HCDR3 98번 잔기에 해당하는 아미노산을 발린으로 치환, 및

KR127 항체의 중쇄의 HCDR3 102번 잔기에 해당하는 아미노산을 아르기닌 또는 알라닌으로 치환.

1020020015708

【청구항 6】

제 5항에 있어서,

KR127 항체의 중쇄의 HCDR1에서 33번, 35번, HCDR2에서 50번, 52번, HCDR3에서 95번, 96번 잔기를 인간화 중쇄 DP7-JH4에 이식하고, HCDR1의 32번 잔기를 알라닌으로, HCDR3의 97번 잔기를 아르기닌 또는 알라닌으로, 98번 잔기를 발린으로, 및 102번 잔기를 아르기닌 또는 알라닌으로 추가로 치환하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【청구항 7】

제 6항에 있어서,

KR127 항체의 중쇄 가변영역에서 골격구조(framework) 3의 71번 알라닌 및 73번 리신 잔기를 인간 중쇄에 추가로 이식하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【청구항 8】

제 3항에 있어서,

KR127 항체의 경쇄의 LCDR1에서 27b번 류신, 27d번 티로신, 27e번 세린, 28번 아스파라긴, 30번 리신, 32번 티로신 및 34번 티로신 잔기, LCDR2에서 50번 류신 및 55번 아스파르트산 잔기, 및 LCDR3에서 89번 발린, 90번 글루타민, 91번 글리신, 92번 트레오닌, 93번 히스티딘, 94번 페닐알라닌, 95번 프롤린 및 96번 글루타민 잔기 중 하나 이상의 잔기를 인간 항체의 경쇄의 대응 아미노산과 비교하여 인간 항체에 이식하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서,

KR127 항체의 경쇄의 LCDR1에서 27d번 티로신, 28번 아스파라진 및 34번 아스파라진 잔기, LCDR2에서 50번 류신 및 55번 아스파르트산 잔기, 및 LCDR3에서 89번 발린, 91번 글리신, 92번 트레오닌, 93번 히스티딘, 94번 페닐알라닌 및 96번 글루타민 잔기 중 어느 하나 이상의 잔기를 인간 경쇄 DPK12-JK4에 이식하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【청구항 10】

제 8항에 있어서,

KR127 항체의 경쇄 가변영역에서 골격구조 2의 36번 류신 및 46번 아르기닌 잔기를 인간 경쇄 DPK12-JK4에 추가로 이식하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【청구항 11】

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 방법으로 제조되고, CDR 이식에 의해 제조된 항체보다 HAMA(human anti-mouse antibody) 반응은 감소하고, 항원 결합친화도가 8.2×10^{-9} M 보다 높은 인간화 항체.

【청구항 12】

제 11항에 있어서,

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역을 포함하는 HBV의 pre-S1 항원에 대한 인간화 항체.

【청구항 13】

제 11항에 있어서,

서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 HBV의 pre-S1 항원에 대한 인간화 항체.

【청구항 14】

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서,
세포주 CHO/HuKR127(기탁번호: KCTC 10199BP)에 의해 생산된 것임을 특징으로 하는 인간
화 항체.

【청구항 15】

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 가변영역을 포함하는 인간화 중쇄를 코드하는, HBV
pre-S1 항원에 대한 인간화 항체의 중쇄 DNA.

【청구항 16】

제 15항에 있어서,
가변영역이 서열번호: 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 중쇄 DNA.

【청구항 17】

서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 가변영역을 포함하는 인간화 경쇄를 코드하는, HBV
pre-S1 항원에 대한 인간화 항체의 경쇄 DNA.

【청구항 18】

제 17항에 있어서,
가변영역이 서열번호: 3의 뉴클레오티드 서열을 갖는 경쇄 DNA.

【청구항 19】

제 16항의 DNA를 포함하는, HBV pre-S1 항원에 대한 인간화 항체의 중쇄 발현벡터
pHuKR127HC.

【청구항 20】

제 18항의 DNA를 포함하는, HBV pre-S1 항원에 대한 인간화 항체의 경쇄 발현벡터 pHuKR127KC.

【청구항 21】

제 16항 및 제 18항의 DNA를 동시에 포함하는, HBV pre-S1 항원에 대한 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 발현벡터 pdCMV-dhfrC-HuKR127.

【청구항 22】

제 21항의 벡터로 형질전환된 대장균 세포주 DH5 α /pdCMV-dhfrC-HuKR127(기탁번호: KCTC 10198BP).

【청구항 23】

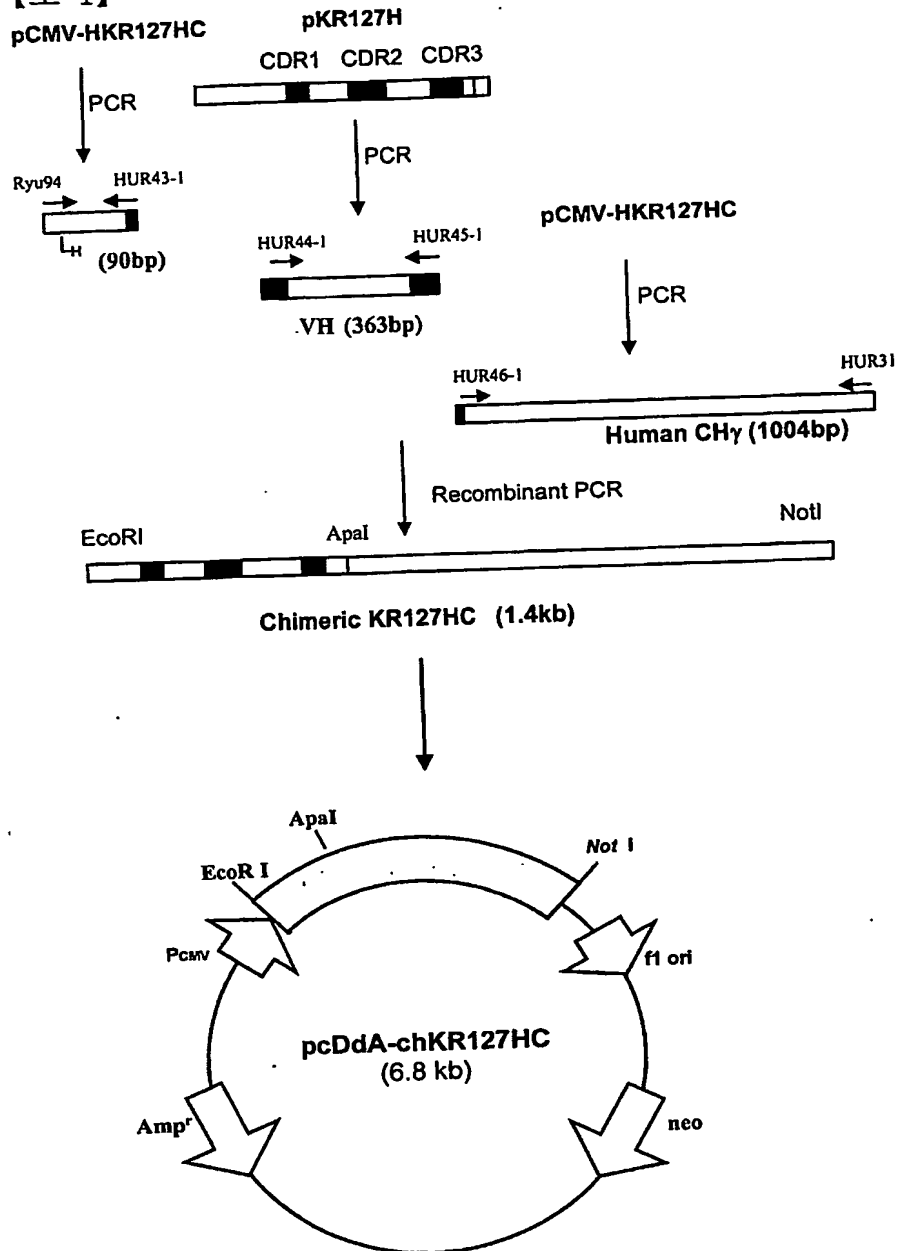
제 11항의 인간화 항체를 생산하는 CHO 세포주 CHO/HuKR127(기탁번호: KCTC 10199BP).

【청구항 24】

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 인간화 항체를 포함하는, HBV 감염의 예방 및 만성 B형 간염의 치료용 조성물.

【도면】

【도 1】



【도 2a】

	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P
KR127VH	CAG	GTC	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGA	CCT	GAA	CTG	GTG	AAG	CCT 42
	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P
DP7	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	CCT
HZ I	CAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGA	GCT	GAA	GTG	GTG	AAG	CCT
HZ VII	CAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGA	GCT	GAA	GTG	AAG	AAG	CCT
HZ I	-	-	-	-	V	-	-	-	A	-	V	-	-	-
HZ VII	-	-	-	-	V	-	-	-	A	-	V	K	-	-

	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	A
KR127VH	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	GCA 84
	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T
DP7	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCA	TCT	GGA	TAC	ACC
HZ I	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	GCA
HZ VII	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC
HZ I	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-
HZVII	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	T

CDR1

	F	S	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	W	V	K	Q	R	P	G
KR127VH	TTC	AGT	AGT	TCT	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA 126
	F	T	S	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
DP7	TTC	ACC	AGC	TAC	TAT	ATG	CAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGA
HZ I	TTC	AGT	AGT	TCT	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGA
HZ VII	TTC	ACC	AGT	GCT	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGA
HZ I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	A	-	-
HZVII	-	T	-	A	-	-	-	-	-	R	-	A	-	-

CDR2

	Q	G	L	E	<u>W</u>	I	G	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>G</u>
KR127VH	CAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CGG	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGA 168
	Q	G	L	E	W	M	G	I	I	N	P	S	G	G
DP7	CAA	GGG	CTT	GAG	TGG	ATG	GGA	ATA	ATC	AAC	CCT	AGT	GGT	GGT
HZ I	CAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CGG	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGA
HZVII	CAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATG	GGA	CGG	ATT	TAT	CCT	AGT	GGT	GGA
HZ I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HZVII	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	S	G	-

【도 2b】

CDR2

	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G	K	A	T	L	
KR127VH	GAT	ACT	AAC	TAC	AAT	GGG	AAG	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	CTG	210
	S	T	S	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	
DP7	AGC	ACA	AGC	TAC	GCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GTC	ACC	ATG	
HZI	GAT	ACT	AAC	TAC	GCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GGC	AAG	GCC	ACA	CTG	
HZVII	AGC	ACT	AGC	TAC	GCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GTC	ACA	ATG	
HZI	-	-	-	-	A	Q	-	-	Q	-	-	-	-	-	
HZVII	S	-	S	-	A	Q	-	-	Q	-	R	V	-	M	

	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	
KR127VH	ACT	GCA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	252
	T	R	D	T	S	T	S	T	V	Y	M	E	L	S	
DP7	ACC	AGG	GAC	ACG	TCC	ACG	AGC	ACA	GTC	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC	
HZI	ACT	GCA	GAC	AAA	TCC	ACG	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	GAG	CTC	AGC	
HZVII	ACT	GCA	GAC	AAA	TCC	ACG	AGC	ACA	GTC	TAC	ATG	GAG	CTC	AGC	
HZI	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	E	-	-	
HZVII	-	-	-	-	-	T	-	-	V	-	-	E	-	-	

	S	L	T	S	V	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	
KR127VH	AGC	CTG	ACC	TCT	GTG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	294
	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	
DP7	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACG	GCG	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	
HZI	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACG	GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	
HZVII	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACG	GCG	GTG	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	
HZI	-	-	R	-	E	-	T	-	-	-	-	-	-	-	
HZVII	-	-	R	-	E	-	T	-	-	-	Y	-	-	-	

CDR3

	E	Y	D	E	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	
KR127VH	GAG	TAC	GAC	GAG	GCT	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT	336
							W	G	Q	G	T	L	V	T	
HZI	GAG	TAC	GAC	GAG	GCT	TAC	TGG	GGC	CAA	GGA	ACT	CTG	GTC	ACT	
HZVII	GAG	TAC	CGG	GTT	GCC	CGT	TGG	GGC	CAA	GGA	ACT	CTG	GTC	ACT	
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HZVII	-	-	R	V	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	

1020020015708

출력 일자: 2003/2/15

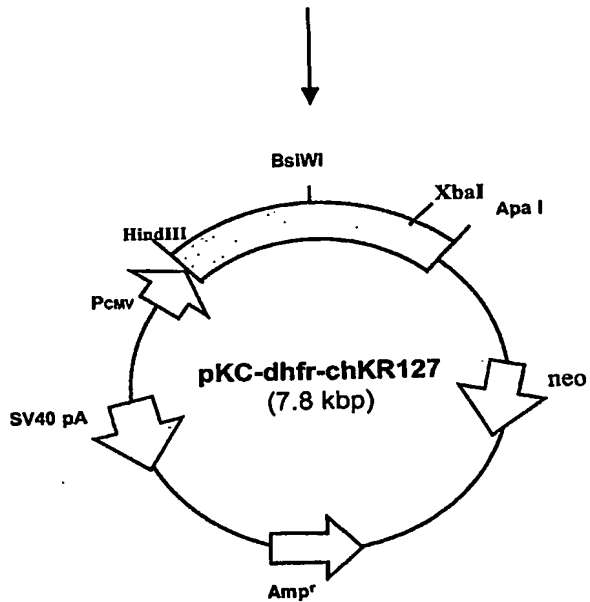
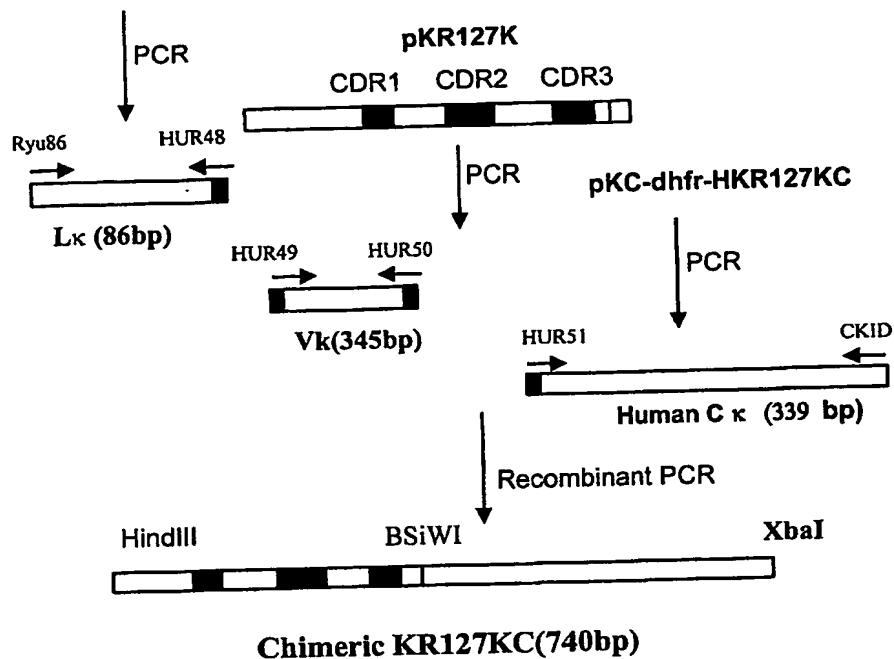
【도 2c】

	V	S	A
KR127VH	GTC	TCT	GCA 345
	V	S	S
HZI	GTC	TCT	TCA
HZVII	GTC	TCT	TCA
HZI	-	-	S
HZVII	-	-	S

1020020015708

【도 3】

pKC-dhfr-HKR127KC



【도 4a】

	D	I	L	M	T	Q	T	P	L	I	L	S	V	T
KR127VK	GAT	ATC	TTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTT	ATT	TTG	TCG	GTT	ACC 42
	D	I	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	S	V	T
DPK12	GAT	ATT	GTG	ATG	ACC	CAG	ACT	CCA	CTC	TCT	CTG	TCC	GTC	ACC
HZI	GAT	ATC	TTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTT	TCT	TTG	TCG	GTT	ACC
HZIV	GAT	ATC	GTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTT	TCT	TTG	TCG	GTT	ACC
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
HZIV	-	-	V	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-

	CDR1													
	I	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S
KR127VK	ATT	GGA	CAA	CCA	GCC	TCT	ATC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	AGC 84
	P	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S
DPK12	OCT	GGA	CAG	CCG	GCC	TCC	ATC	TCC	TGC	AAG	TCT	AGT	CAG	AGC
HZI	OCT	GGA	CAA	CCA	GCC	TCT	ATC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	AGC
HZIV	OCT	GGA	CAA	CCA	GCC	TCT	ATC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	AGC
HZI	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HZIV	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR1													
	L	L	Y	S	N	G	K	T	Y	L	N	W	L	L
KR127VK	CTC	TTA	TAT	AGT	AAT	GGA	AAA	ACC	TAT	TTG	AAT	TGG	TTA	TTA 126
	L	L	H	S	D	G	K	T	Y	L	Y	W	Y	L
DPK12	CTC	CTG	CAT	AGT	GAT	GGA	AAG	ACC	TAT	TTG	TAT	TGG	TAC	CTG
HZI	CTC	TTA	TAT	AGT	AAT	GGA	AAA	ACC	TAT	TTG	AAT	TGG	TTA	TTA
HZIV	CTC	TTA	TAT	AGT	AAT	GGA	AAA	ACC	TAT	TTG	AAT	TGG	TTA	TTA
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HZIV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR2													
	Q	R	P	G	Q	S	P	K	R	L	I	Y	L	V
KR127VK	CAG	AGG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CGC	CTA	ATC	TAT	CTG	GTG 168
	Q	K	P	G	Q	P	P	Q	L	L	I	Y	E	V
DPK12	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	OCT	CCA	CAG	CTC	CTG	ATC	TAT	GAA	GTT
HZI	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CGC	CTA	ATC	TAT	CTG	GTG
HZIV	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	OCT	CCA	CAG	CGC	CTA	ATC	TAT	CTG	GTG
HZI	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HZIV	-	K	-	-	-	P	-	Q	-	-	-	-	-	-

【도 4b】

CDR2

	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	G	V	P	D	R	F	T	G	S	
KR127VK	TCT	AAA	CTG	GAC	TCT	GGA	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	ACT	GGC	AGT	210
	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	
DPK12	TCC	AAC	CGG	TTC	TCT	GGA	GTG	CCA	GAT	AGG	TTC	AGT	GGC	AGC	
HZ1	TCT	AAA	CTG	GAC	TCT	GGA	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	
HZ1V	TCT	AAT	CGG	GAC	TCT	GGA	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	
HZ1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	
HZ1V	-	N	R	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	

	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	I	R	V	E	
KR127VK	GGA	TCA	GGA	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	ATC	AGA	GTG	GAG	252
	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	
DPK12	GGG	TCA	GGG	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	CGG	GTG	GAG	
HZ1	GGA	TCA	GGA	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	
HZ1V	GGA	TCA	GGA	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	
HZ1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	
HZ1V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	

CDR3

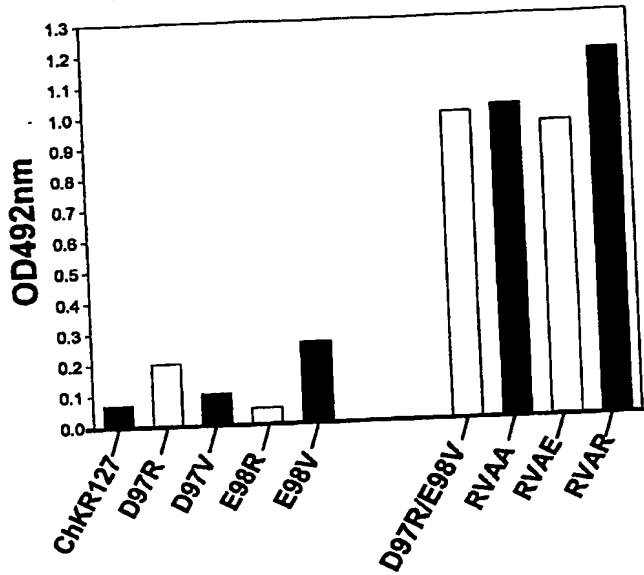
	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>H</u>	
KR127VK	GCT	GAG	GAT	TTG	GGA	GTT	TAT	TAC	TGC	GTG	CAA	GGT	ACA	CAT	294
	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	S	I	Q	
DPK12	GCT	GAG	GAT	GTT	GGG	GTT	TAT	TAC	TGC	ATG	CAA	AGT	ATA	CAG	
HZ1	GCT	GAG	GAT	GTT	GGA	GTT	TAT	TAC	TGC	GTG	CAA	GGT	ACA	CAT	
HZ1V	GCT	GAG	GAT	GTT	GGA	GTT	TAT	TAC	TGC	GTG	CAA	GGT	ACA	CAT	
HZ1	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HZ1V	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CDR3

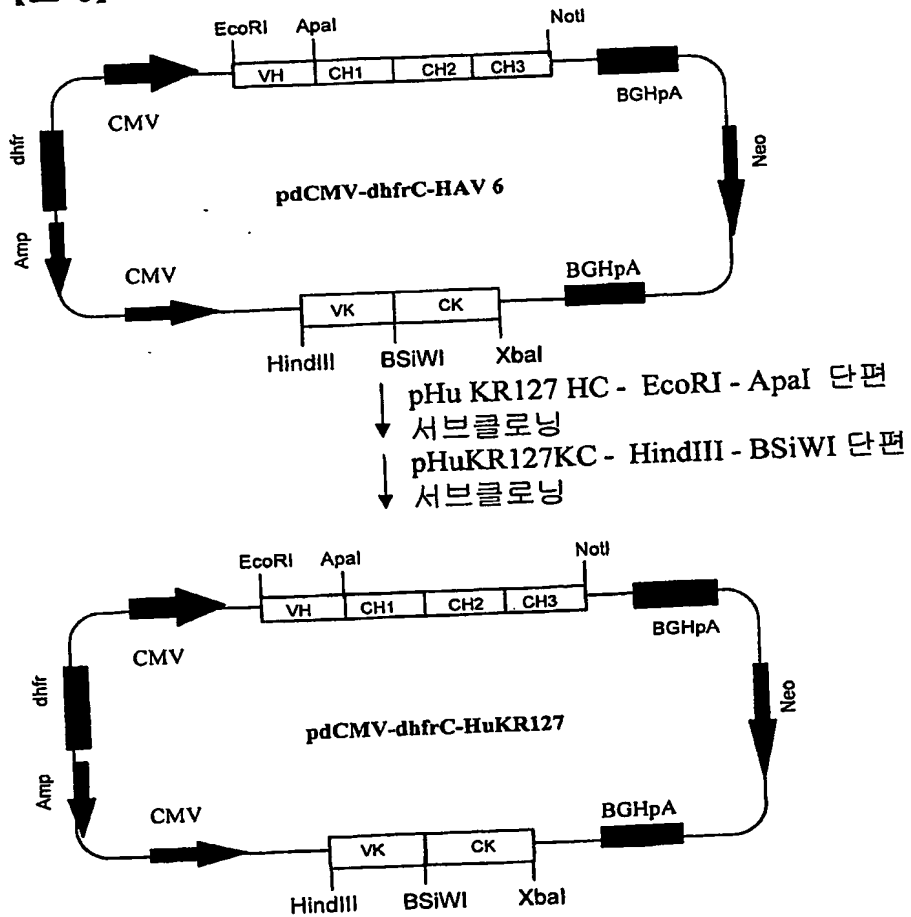
	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	
KR127VK	TTT	CCT	CAG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	336
	L	P		T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	
DPK12	CTT	CCT	CC							(JK4)					
HZ1	TTT	CCT	CAG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	GTG	GAA	ATC	AAA	
HZ1V	TTT	CCT	CAG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	GTG	GAA	ATC	AAA	
HZ1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	
HZ1V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	

【도 5】

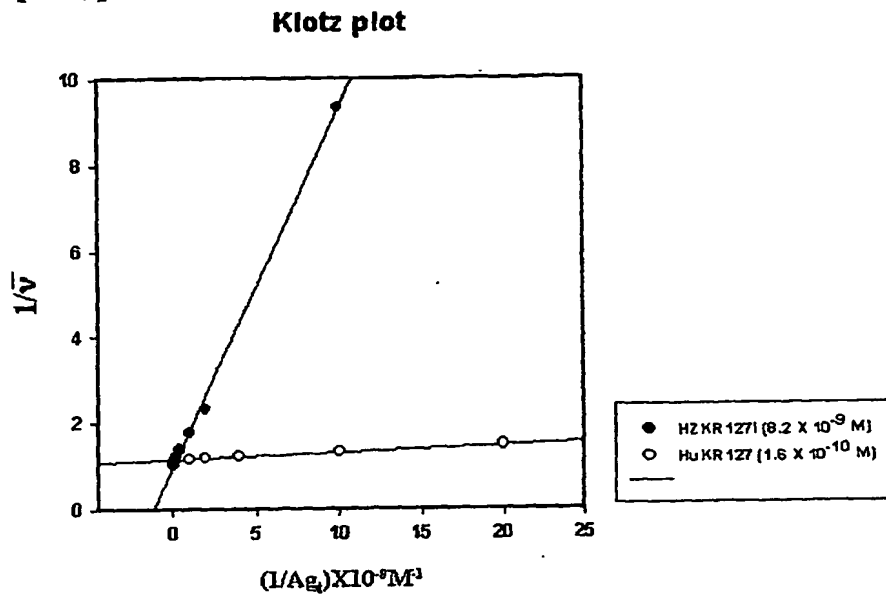
Indirect ELISA of HCDR3 variants



【도 6】



【도 7】



【서열목록】

<110> APROGEN INC. <120> HUMANIZED ANTIBODY AND PROCESS FOR PREPARING SAME <
 160> 38 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 345 <212> DNA <213>
 Artificial Sequence <220> <223> HEAVY CHAIN of HZVII <400> 1 caggtccagc
 tgggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60 tcctgcaaag
 cttctggcta caccttcacc agtgcttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120 cctggacagg
 gtcttgagtg gatgggacgg atttataccta gtggtggaag cactagctac 180 gcacagaagt
 tccagggcag agtcacaatg actgcagaca aatccacgag cacagtctac 240 atggagctca
 gcagcctgag atctgaggac acggcgggtgt attactgtgc aagagagtac 300 cgggttgccc
 gttggggcca aggaactctg gtcactgtct ctica 345 <210> 2 <211>

115 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> HEAVY CHAIN of HZVII <

400> 2 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Ala Pro Gly Ala 1

5 10 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

Tyr Thr Phe Thr Ser Ala 20 25 30 Trp

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35

40 45 Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys

Phe 50 55 60 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr 65 70 75

80 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95 Ala Arg Glu Tyr Arg Val Ala Arg Trp Gly

Gln Gly Thr Leu Val Thr 100 105 110 Val

Ser Ala 115 <210> 3 <211> 336 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> LIGHT CHAIN of HZVII <400> 3 gatatcgtga tgacccaaac

tccactttct ttgtcggta cccctggaca accagcctct 60 atctcttgca agtcaagtca

gagcctctta tatagtaatg gaaaaaccta tttgaattgg 120 ttattacaga agccaggcca

gcctccacag cgcctaactc atctggtgtc taatcgggac 180 tctggagtcc ctgacaggtt

cagtggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240 agcagagtgg aggctgagga

tgttggagtt tattactgcg tgcaaggtac acattttcct 300 cagacgttcg gtggaggcac

caaggtggaa atcaaa 336 <210> 4 <211> 112 <212>

PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> LIGHT CHAIN of HZVII <400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly 1 5

출력 일자: 2003/2/15

65-58

28 <210> 11 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Ryu86 <400> 11 caaagcttgg aagcaagatg gattca
 26 <210> 12 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 HUR48 <400> 12 caagatatcc ccacaggtac cagatac
 27 <210> 13 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 HUR49 <400> 13 tgtggggata tcttgatgac ccaaact
 27 <210> 14 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 HUR50 <400> 14 cacagatctt ttgatttcca gcttgg
 27 <210> 15 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 HUR51 <400> 15 atcaaaagat ctgtggctgc accatct
 27 <210> 16 <211> 58 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 CK1D <400> 16 ggcgcgtcta gaattaacac tctcccctgt tgaagctctt tgtgacgggc gaactcag
 58 <210> 17 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 YM001N <400> 17 ccggaattca cattcacgat gtacttg
 27 <210> 18 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 YM003 <400> 18 tgccccccaga ggtgct
 16 <210> 19 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 ym257 <400> 19 acgcattcag tgcttcttgg atgaactggg tga
 33 <210> 20 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 YM258 <400> 20 atccaagaag cactgaatgc gtagccagaa g
 31 <210> 21 <211> 38 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

YM004 <400> 21 ccaattcaaa gcggtttttc cattactata taagaggc

38 <210> 22 <211> 32 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

YM009 <400> 22 gcagccaccg tacgtttgat ttccaccttg gt

32 <210> 23 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Ryu 166 <400> 23 ggatttgtct gcagtcattg tggctctgcc ctggaactt

39 <210> 24 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Hur 37 <400> 24 gacaaatcca cgagcacagt ctacatg

27 <210> 25 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Ryu 118 <400> 25 ctgtggaggc tggcctggct tctgtaataa cca

33 <210> 26 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Ryu 119 <400> 26 ggccagcctc cacagctcct aatctatctg

30 <210> 27 <211> 345 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

KR127VH <400> 27 caggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcctc

agtgaagatt 60 tcctgcaaag cttctggcta cgcattcagt agttcttgga tgaactgggt

gaagcagagg 120 cctggacagg gtcttgagtg gattggacgg atttaccctg gagatggaga

tactaactac 180 aatgggaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag

cacagcctac 240 atgcagctca gcagcctgac ctctgtggac tctgcggctc atttctgtgc

aagagagtac 300 gacgaggctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca

345 <210> 28 <211> 115 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>

KR127VH <400> 28 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser 20 25
 30 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35
 40 45 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
 Phe 50 55 60 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75
 80 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95 Ala Arg Glu Tyr Asp Glu Ala Tyr Trp Gly
 Gln Gly Thr Leu Val Thr 100 105 110 Val
 Ser Ala 115 <210> 29 <211> 336 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> KR127VK <400> 29 gatatcttga tgacccaaac tccacttatt
 ttgtcgggta ccattggaca accagcctct 60 atctcttgca agtcaagtca gagcctctta
 tatagtaatg gaaaaaccta ttgaattgg 120 ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag
 cgcctaattct atctggtgtc taaactggac 180 tctggagtcc ctgacagggtt cactggcagt
 ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240 atcagagtgg aggctgagga tttgggagtt
 tattactgcg tgcaaggtac acattttcct 300 cagacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa
 336 <210> 30 <211> 112 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 KR127VK <400> 30 Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ile Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15 Gln Pro Ala Ser Ile Ser
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser 20 25
 30 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser 35
 40 45 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val

1020020015708

출력 일자: 2003/2/15

Pro 50 55 60 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75
 80 Ile Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
 85 90 95 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110 <
 210> 31 <211> 294 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 DP7 <400> 31 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggt
 60 tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaga 294 <210>
 32 <211> 98 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> DP7 <400>
 32 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1
 5 10 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 20 25 30 Tyr
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35
 40 45 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys
 Phe 50 55 60 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg
 Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr 65 70 75
 80 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95 Ala Arg <210> 33 <211> 302 <212>

1020020015708

출력 일자: 2003/2/15

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> DPK12 <400> 33 gatattgtga
 tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60 atctcctgca
 agtctagtca gaggctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120 tacctgcaga
 agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtctt caaccggttc 180 tctggagtgc
 cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240 agccgggttg
 aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300 cc
 302 <210> 34 <211> 100 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 DPK12 <400> 34 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15 Gln Pro Ala Ser Ile Ser
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser 20 25
 30 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro 35
 40 45 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 Pro 50 55 60 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75
 80 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95 Ile Gln Leu Pro 100 <210>
 35 <211> 345 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> HEAVY
 CHAIN of HZI <400> 35 caggtccagc tgggtgcagtc tggagctgaa gtggtgaagc ctggggcctc
 agtgaaggtt 60 tcctgcaaag cttctggcta cgcattcagt agttcttgga tgaactgggt
 gcgacaggcc 120 cctggacagg gtcttgagtg gattggacgg atttattcctg gagatggaga
 tactaactac 180 gcacagaagt tccagggcaa ggccacactg actgcagaca aatccacgag

1020020015708

출력 일자: 2003/2/15

cacagcctac 240 atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcgtct atttctgtgc
aagagagtac 300 gacgaggctt actggggcca aggaactctg gtcactgtct ctca
345 <210> 36 <211> 115 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
HEAVY CHAIN of HZI <400> 36 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys
Pro Gly Ala 1 5 10 15 Ser Val Lys
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser 20
25 30 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Ile 35 40 45 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp
Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr 65
70 75 80 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
Thr Ala Val Tyr Phe Cys 85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Asp Glu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr 100
105 110 Val Ser Ser 115 <210> 37 <211> 336 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> LIGHT CHAIN of HZI <400> 37
gatattctga tgacccaaac tccactttct ttgtcggta cccctggaca accagcctct 60
atctcttgca agtcaagtca ggcctctta tatagtaatg gaaaaaccta tttgaattgg 120
ttattacaga agccaggcca gtctccaaag cgcctaattct atctgggtgtc taaactggac 180
tctggagtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgcg tgcaaggtac acattttcct 300
cagacgttcg gtggaggcac caaggtggaa atcaaa 336 <210>

출력 일자: 2003/2/15

1020020015708

38 <211> 112 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> LIGHT
CHAIN of HZI <400> 38 Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro
Gly 1 5 10 15 Gln Pro Ala Ser Ile
Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser 20 25
30 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser 35
40 45 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val
Pro 50 55 60 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75
80 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
85 90 95 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly
Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105 110